

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
(im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

Etablierung eines digitalen Bildgebungssystems zur Dokumentation zellulärer Interaktionen  
auf dem Gewebekulturmikroskop. Erprobung an speziell etablierten Kulturen mikrovaskulärer  
Endothelzellen aus dem Koronarsystem von Ratte und Mensch

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Florian Rampp  
aus  
Krumbach  
2017



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Stephan Nees

---

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl-Hans Englmeier

---

Betreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter:

---

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2017

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1. Einleitung und Zielsetzung**

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Chemikalien**

#### **2.1.2 Enzyme**

#### **2.1.3 Zellkulturmaterial**

#### **2.1.4 Sonstiges**

### **2.2 Lösungen**

### **2.3 Geräte**

### **2.4 Software**

### **2.5 Methoden**

#### **2.5.1 Isolierung verschiedener Zellarten**

##### **2.5.1.1 Venuläre Endothelzellen aus Rattenherzen**

##### **2.5.1.2 Venuläre Endothelzellen aus Menschenherzen**

##### **2.5.1.3 Isolierung von Plättchen und PMN aus Vollblut**

#### **2.5.2 Verschiedene Methoden zur Zellreinigung und Zellkonservierung**

##### **2.5.2.1 Reinigung von diversen Endothelzellarten mit Hilfe von eingestellten Protaminchlorid-Lösungen**

##### **2.5.2.2 Konservierung gereinigter Zellen in flüssigem Stickstoff**

##### **2.5.2.3 Revitalisierung kryokonservierter Zellpräparate**

#### **2.5.3 Verfahren zur histologischen Identifizierung von Endothelzellen und Perizyten**

##### **2.5.3.1 Anfertigung von Mikrotomschnitten**

##### **2.5.3.2 Enzymhistochemische Verfahren**

##### **2.5.3.3 Rasterelektronenmikroskopie**

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Etablierung reiner Kulturen von venulären Endothelzellen aus Mikrogefäßen des Herzens**

#### **3.1.1 Aus Mikrogefäßen des Herzens der Ratte**

#### **3.1.2 Aus Mikrogefäßen des menschlichen Herzens**

### **3.2 Grundlegende methodische und apparative Entwicklungsarbeiten als Vorbereitung diskontinuierlicher und kontinuierlicher Beobachtungen von lebenden Zellsystemen bis zur Grenze der Lichtmikroskopie**

- 3.2.1 Sicherstellen möglichst physiologischer Umgebungsbedingungen für die verwendeten Zellkulturen während der mikroskopischen Betrachtung
- 3.2.2 Einstellung eines konstanten CO<sub>2</sub>-Partialdruckes im Kulturmedium
- 3.2.3 Schaffung konstanter Inkubationstemperaturen im beobachteten Mikroskopfeld
- 3.2.4 Technische Vorkehrungen zur Vermeidung phototoxischer Effekte
- 3.2.5 Externe Zugabemöglichkeit von Reaktionskomponenten bzw. Abnahme von Probevolumina aus der Kulturschale während des Versuchs
- 3.2.6 Vergleich der optischen Leistungsfähigkeit verschiedener Objektive

### **3.3 Möglichkeiten und Grenzen verschiedener Verfahren zur kinematographischen Abbildung lebender Zellsysteme**

- 3.3.1 Konventionelle Mikrophotographie
- 3.3.2 Echtzeit-Filmsequenzen mit analoger Videokinematographie
- 3.3.3 Echtzeit-Filmsequenzen mit digitaler Videokinematographie
- 3.3.4 Zeitrafferdokumentation zellulärer Wechselwirkungen durch computergestützte Aufnahmeverfahren sowie Weiterverarbeitung des gewonnenen Datenrohmaterials

### **3.4 Anwendungen: Reaktionen und Interaktionen von PMN und Thrombozyten auf mikrovaskulären venulären Endothelzellen in der simulierten Inflammation**

- 3.4.1 Phototoxische Schädigung des Endothels
- 3.4.2 Isolierung von PMN und Thrombozyten sowie deren Aktivierung durch Entzündungsmediatoren
- 3.4.3 Schädigung von venuläres Endothel durch stimulierte PMN und Thrombozyten mit weitgehender Reversibilität nach Zugabe von Flavonoiden

## **4. Diskussion**

### **4.1 Vorteile und Limitationen der konventionelle Mikrophotographie, der analoger Videokinematographie und der computergestützten Aufnahmeverfahren**

- 4.1.1 Konventionelle Photographie
- 4.1.2 Analoge Aufnahmeverfahren

4.1.3 Computergestützte Aufnahmeverfahren

4.1.4 Praktische Handhabung digitaler Bild- und Videodaten

## **4.2 Anwendungsgebiete der verschiedenen Bildgewinnungsverfahren**

4.2.1 Nichtdynamische Systeme

4.2.2 Dynamische Systeme

4.2.3 Hochdynamische Systeme

## **4.3 Die Bedeutung von Umgebungsfaktoren für die mikroskopische Beobachtung lebender Zellsysteme über längere Zeiträume**

## **4.4 Isolierung und Identifizierung venulärer Endothelzellen aus dem Ratten- und Menschenherzen sowie Erkenntnisse über zelluläre Wechselwirkungen venulärer, arteriolärer und kapillärer kardialer Endothelzellen durch videomikroskopische Zeitrafferbeobachtung**

4.4.1 Isolierung und Identifizierung venulärer Endothelzellen

4.4.2 Verminderte Endotheldichte infolge der Entzündungssituationen

4.4.3 Antiphlogistische Substanzen beeinflussen die entzündliche Reaktion an der Endothelbarriere

## **4.5 Ausblick**

# **5. Zusammenfassung**

# **6. Literaturverzeichnis**

# **7. Danksagung**

# 1. Einleitung und Zielsetzung

Viele zelluläre Prozesse entfalten eine typische Dynamik die, wie zum Beispiel die Kontraktion der Herzmuskelzelle, sehr rasch, oder aber, wie beispielsweise die Zellteilung, sehr langsam ablaufen können. Mit Hilfe moderner mikroskopischer Techniken und bildgebenden Dokumentationsverfahren ist die Ausgangsbasis geschaffen worden, den Zeitverlauf zellulärer Reaktionen nicht nur wie bisher in photographischen Einzelbildern oder in grobkörnigen Bewegtbildern festzuhalten, sondern auch in qualitativ hochwertigen Filmen bis ins Detail studieren zu können. Im Verein mit der Entwicklung innovativer mikroskopischer Darstellungsverfahren (Lebendmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, Laser-Scanning, 2-Photonen-Lasertechnik, etc.) ergeben sich künftig völlig neue Möglichkeiten zur Erkennung und Differenzierung zellulärer Abläufe.

Um das breit gefächerte Spektrum der unterschiedlichsten zellulären Reaktionen in ihrer Dynamik studieren zu können ist es notwendig, verschiedene filmische Verfahren zu nutzen, welche jeweils für bestimmte Aufgabenstellungen besser geeignet sind. Diese Verfahren lassen sich grob unterteilen in analoge Aufnahmeverfahren, analoge Aufnahmeverfahren mit digitaler Bildspeicherung und in digitale Aufnahmeverfahren.

Um analoge Videofilme von mikroskopischen Geschehen zu erhalten, ist es nötig, den C-Mount des Mikroskops mittels Adapter mit einer CCD-Kamera zu bestücken. Eine CCD-Kamera enthält auf ihrer lichtempfindlichen Einheit ein Feld aus semikonduktiven Elementen, welche in Proportion zu ihrer Lichtexposition eine Ladung aufbauen und somit ein Bild erzeugen. Dieses Bild wird durch sequenzielle Konvertierung der Ladung jedes Elements in eine Spannung in ein Videobild übersetzt. Der Transfer der Ladung entlädt die Elemente und macht sie bereit für das nächste Bild, die Expositionszeit ist somit identisch mit der Zeit zwischen den Entladungsvorgängen (normalerweise beträgt dieser Zeitraum 1/30s, entsprechend dem amerikanischen Videostandard NTSC, der 30 Bilder pro Sekunde verlangt)<sup>80,75,66</sup>. Konventionelle Videobilder werden aus zwei überlappenden Linien-Scans zusammengesetzt. Die tatsächliche Zahl der Linien in jedem Scan hängt vom verwendeten Videostandard ab. Beim amerikanischen NTSC-Standard, der mit 60 Hz operiert, hat jedes Bild 512 Linien, wovon jedoch nur 480 Linien Bildinformationen enthalten. Der europäische

PAL-Standard erzeugt bei 50 Hz Bilder, welche 625 Linien, davon 512 Linien mit Bildinformation besitzen<sup>27</sup>. Es ist nur mit aufwendigen Modifikationen möglich, dieses Korsett der Videostandards zu verlassen, beispielsweise um für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen eine höhere Bildfrequenz zu erzielen. Eine Erhöhung der Bildauflösung ist mit handelsüblicher Ausrüstung nicht möglich.

Es ist aber möglich, die einschränkenden Videostandards zu umgehen, indem man das Ausgangssignal der CCD-Kamera mittels einer Frame-Grabber-Karte für den PCI-Steckplatz des Rechners direkt auf den Computer lenkt, die analogen Bildinformationen können dort dann digital abgespeichert werden<sup>27,14,11,2,57</sup>. Doch momentan kann aufgrund technischer Beschränkungen die Bildauflösung 512x512 Pixel bei 8 Bit Farbauflösung (entspricht Schwarzweißdarstellung bei 256 Graustufen) nicht überschritten werden, da weiterhin eine Aufnahme Frequenz von 30 Bilder pro Sekunde vorgegeben ist (siehe oben). Ebenfalls möglich ist die Aufnahme von Realzeit- und Zeitraffervideofilmen auf digitalen Videorekordern. Diese beiden Verfahren haben den Vorteil, dass die analogen Bilder nun schon digital gespeichert werden und somit am Computer weiterbearbeitet<sup>26</sup> und verwendet werden können<sup>82,24,25</sup>. Allerdings muss hier aus Praktikabilitätsgründen oft eine Komprimierung der Bildinformationen durch entsprechende Algorithmen stattfinden<sup>76,21,7,45,9</sup>.

Zu Beginn der Arbeiten war schon eine eine völlig neue Generation von digitalen Farbkameras auf dem Markt, welche nun auch für den Einsatz am Mikroskop interessant ist. Solche wissenschaftlichen Kameras, welche speziell für den Einsatz am C-Mount des Mikroskops optimiert wurden, waren beispielsweise die Axiocam (Zeiss), die MDS 290 (Kodak) oder die Spot (Diagnostic Instruments). All diese Kameras können mit hoher Bildauflösung filmen, sind voll Computergesteuert und haben eine gute Datenübertragungsrate. Somit scheint es erstmals möglich, Bilder und Filmsequenzen ohne analoge Zwischenschritte digital und in hoher Bildqualität zu erhalten. Dadurch steht eine Vielzahl von neuen Anwendungsmöglichkeiten offen.

Es erschien mir zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen sehr interessant, die fragmentarisch verfügbaren technischen Gerätschaften in ein funktionierendes mikroskopisches System zu integrieren und dann mit bisher nicht bekannter technischer

Präzision Zeitrafferbildsequenzen aufzunehmen und sie zur Dokumentation zellulärer Reaktionen und Interaktionen einzusetzen.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nees am Physiologischen Institut der LMU bot sich für mich die Gelegenheit, zunächst anspruchsvolle Techniken der Zellisolierung und -Züchtung zu erlernen, und sie dann zur Etablierung geeigneter Zell- bzw. Organkulturen auf dem Mikroskoptisch einzusetzen. Im Mittelpunkt des Interesses der Arbeitsgruppe standen damals hochspezifische Wechselwirkungen des venulären Endothels mit den neutrophilen Granulozyten und den Thrombozyten des Blutes, die man als wichtige Vorbedingung für die Öffnung der venulären Schranke zwischen dem Blut und angrenzendem Organgewebe im Rahmen entzündlicher Prozesse erkannt hatte. Unter solchen Gegebenheiten kommt es zur Rekrutierung der Immunabwehr vom Intravasal- in den Extravasalraum. Es erschien deshalb hochinteressant, die zeitabhängigen Reaktionen des venulären Endothels, aber auch die Interaktionen der Blutzellen und die Diapedese der Leukozyten unter definierten in-vitro-Bedingungen und bei starker Vergrößerung zu beobachten und zu dokumentieren.

Vor diesem Hintergrund wurden folgende Zielsetzungen für die vorliegende Dissertationsarbeit formuliert:

1. Apparativer und bedienungstechnischer Aufbau verschiedener geeigneter bildgebender Dokumentationsverfahren, Integration zu einem Gesamtsystem
2. Einrichtung einer Thermokammer zur direkten Langzeitbeobachtung von Zellen, Blutgefäßen oder Zellkulturen unter weitgehend physiologischen Inkubationsbedingungen auf dem Mikroskoptisch
3. Isolierung diverser Zellsysteme auf dem Boden von Verfahren der Arbeitsgruppe, besonderer Schwerpunkt sollte hierbei auf die Entwicklung eines Verfahrens zur Isolation reiner venulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen (in enger Anlehnung an bereits ausgearbeitete Protokolle zur Isolierung von venulären Endothelzellen aus dem Koronarsystem von Meerschwein und Mensch) gelegt werden

4. Anwendung des neu geschaffenen Mikroskopsystems im Rahmen der Dokumentation von Reaktionen und Interaktionen von PMN und Thrombozyten auf mikrovaskuläre Endothelzellen in der simulierten Inflammation

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Chemikalien**

- NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Glucose, Pyruvat, Asparaginsäure, L-Glutamin, L-Arginin, L-Asparaginsäure, Na-Veronal, Formaldehyd 37%, NaOH, KOH, HCl, Methanol, Aceton: Merck, Darmstadt
- Percoll, Kreatin, Taurin, D-Ribose, Albumin („bovine, essential fatty acid free“), Fast-Blue-BB-Diazoniumsalz, Naphthol-AS-MX-Phosphat, Glycin-Prolin-Methoxy- $\beta$ -Naphthylamid (Gly-Pro-M $\beta$ NA), Echtblausalz B, Dimethylformamid DMFA, Dimethylsulfoxid (DMSO), FMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin): Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Polymorphoprep: Nycomed, Oslo, Norwegen
- Fragmin Injektionslösung: Pharmacia, Erlangen
- Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm: Ratiopharm GmbH, Ulm
- Natriumcitrat-Lösung 3,13%: Fresenius AG, Bad Homburg
- Papaverin: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Rompun 2% Injektionslösung: Bayer Vital, Leverkusen
- Ketanest 50mg/ml Injektionslösung: Parke-Davis, Berlin
- Äther zur Narkose: Hoechst, Frankfurt am Main
- alle weiteren Chemikalien: Merck, Darmstadt



### **2.1.2 Enzyme**

- Kollagenase D, Dispase I, Dispase II: Boehringer, Mannheim
- Trypsin („1:250“), Serva, Heidelberg

### **2.1.3 Zellkulturmaterial**

- Sterile Einmalspritzen (2-, 5-, 10- und 20 ml), Kanülen, Dreiwegehähne: Braun, Melsungen
- Sterile Zentrifugenröhrchen 15- bzw. 50 ml (Falcon 2070 bzw. 2097); Einmalpipetten steril einzeln verpackt (2-, 5-, 10- und 25 ml); sterile Kulturschalen 35 mm (Falcon 3001) und 60 mm (Falcon 3004): Becton Dickinson, Lincoln Park, USA
- Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen: Eppendorf, Hamburg
- Sterilfilter 0,2 µm Millex-GS: Millipore, Molsheim, Frankreich
- Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), Kohlendioxid: Linde, München
- Dreigasgemisch (76% N<sub>2</sub>, 19% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>): Linde, München
- Gelatine (bovine): Sigma, Deisenhofen
- FCS: Boehringer, Mannheim
- Dulbecco's Mod Eagle Medium (MEM), Medium 199 (M199): Gibco Life Technologies, Eggenstein
- Endothelial Cell Growth Medium (ECGM), SupplementMix C-39215, PromoCell, Heidelberg
- Cryotubes 2ml: Nunc, Wiesbaden
- Nylonnetze: ZBF, Rüschlikon, Schweiz
- Glasmaterial: Braun, Melsungen
- Objektträger und Deckgläser: Marienfelder, München
- PTFE-, Vitonschläuche: Labokron, Sinsheim
- Zellulose-Acetat-Filter, Porengröße 0,2 µm: Sartorius, Göttingen

### **2.1.4 Sonstiges**

- Spezielle Glasmaterialien: Glasbläserei Schmitz, München
- Gerätespezialanfertigungen: Werkstatt des Physiologischen Institutes München

## 2.2 Lösungen

Für Zellisolierungszwecke:

- **Kulturmedium I:** MEM, FCS 10% (v/v), L-Glutamin (2mM) , Penicillin/Streptomycin 2% (v/v) (Endkonzentration 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

- **Kulturmedium II:** ECGM, FCS 10% (v/v), L-Glutamin (2mM); durch Zugabe Supplement-Mix C-39215: 2 ml ECGS/H, 0,1 ng/ml EGF, bFGF 1 ng/ml, Hydrocortison 1 µg/ml, Gentamicin, Amphotericin B

- **Einfriermedium I:** M 199, L-Glutamin (2mM), Penicillin/Streptomycin 2% (v/v) (Endkonzentration 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), HEPES (20mM)

- Einfriermedium II: Einfriermedium I, zusätzlich DMSO 20% (v/v)

- **Percoll-Stammlösungen:** Es wurden Percoll-Stammlösungen mit verschiedenen Volumenanteilen Percoll in der Endlösung hergestellt, eingesetzt wurden Percollösungen mit einem Percoll-Volumenanteil von 20 % v/v (Percoll 4) bis 90 % v/v (Percoll 18). Jede Stammlösung enthielt jeweils 5 % v/v ES-Konzentrat und 5 % v/v Hepes-Konzentrat und wurde in Bidest. H<sub>2</sub>O gelöst.

- **Enzymlösung zur Myokarddissoziation (Ratte):** 90 mg Kollagenase D wird über eine Sephadex G 75-Säule gereinigt und mit 10 mg Dispase I und 170 mg bovinem Albumin gemischt und mittels KHM auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Anschließend Filtration über einen 0,2 µm-Sterilfilter.

- **Enzymlösung zur Myokarddissoziation (Mensch):** 90 mg Kollagenase D wird ohne eine Reinigung mittels Sephadex G 75-Säule mit 170 mg bovinem Albumin, 12 mg Trypsin und 25 mg Dispase II gemischt und mittels KHM auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Anschließend Filtration über einen 0,2 µm-Sterilfilter.

Die folgenden Lösungen wurden mit bidestiliertem H<sub>2</sub>O aufbereitet:

- **Krebs-Henseleit-Medium:** NaCl (140 mM), KCl (4,6 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,1 mM), NaHCO<sub>3</sub> (24,8 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 mM), D-Glucose (8,3 mM), Pyruvat (2 mM), Kreatin (10 mM), Taurin (20 mM), D-Ribose (5 mM), L-Asparaginsäure (2 mM), L-Glutamin (2 mM), L-

Arginin (1 mM), Harnsäure (0,05 mM), mit NaOH auf pH 7,40 eingestellt. Sterilisation über einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm.

- **Hepes-Konzentrat:** Hepes (500 mM), 2% (w/v) bovines Albumin. Lösung in bidestilliertem H<sub>2</sub>O, pH auf 7,2 eingestellt mit NaOH. Sterilisation über einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm.

- **ES-Konzentrat (20x):** NaCl (2,33 M), KCl (108 mM), MgSO<sub>4</sub> (16 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mM), Glucose (110 mM). Lösung in bidestilliertem H<sub>2</sub>O, keine pH-Einstellung. Sterilisation über einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm.

- **Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):** NaCl (132 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5mM). Lösung in bidestilliertem H<sub>2</sub>O, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Sterilisation über einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm.

- **Earlesalt (ES):** NaCl (142 mM), KCl (5,4 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (0,8 mM), D-Glucose (5,5 mM). Lösung in bidestilliertem H<sub>2</sub>O, mit NaOH eingestellt auf pH 7,4. Sterilisation über einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm.

- **Kardioplegische Lösung nach Bretschneider:** NaCl (15mM), KCl (9mM), Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat (1mM), Histidin-HCl-H<sub>2</sub>O (18 mM), MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O (4mM), Histidin (180 mM), Tryptophan (2 mM), Mannit (30 mM), CaCl<sub>2</sub> (0,015 mM), eingestellt auf pH 7,40. Sterilisation über einen Filter mit der Porengröße 0,2 µm.

## 2.3 Geräte

**Zentrifugen:**

- Kühlzentrifuge Sigma 4K10: Sigma, Osterode
- Eppendorfszentrifuge 5412: Eppendorf, Hamburg
- Labofuge III: Heraeus Christ, Hanau

**Mikroskop:**

- Axiovert 35: Zeiss, Deutschland
- Axiovert 200M: Zeiss, Deutschland
- Axiovert 25: Zeiss, Deutschland

**Kameras:**

- AxioCam HRC: Zeiss, Deutschland
- AVF-Horn Camera MC 1002: Hans-Peter Horn, Aalen

	- Ricoh XR-X-3000 Analogbildkamera: Vertrieb Zeiss, Deutschland
<b>Videorekorder:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Panasonic Digital Time Lapse D-TL 1: Panasonic, Osaka, Japan</li> <li>- Panasonic Video-Recorder AG-6720A: Panasonic, Osaka, Japan</li> </ul>
<b>Videomonitor:</b>	- Sony PVM 14420M: Sony, Japan
<b>Mikrotom:</b>	- Cryostat CM 3050: Leica, Wetzlar
<b>USV-Gerät:</b>	- APC Smart-UPS 1500, APC, USA
<b>Sterilbank:</b>	- Herasafe: Heraeus Instruments, Hanau
<b>Brutschränke:</b>	- Functionline: Heraeus Instruments, Hanau
<b>Dampfsterilisator:</b>	- National Steril-Quick 704-9000-D: Heinicke Company, USA
<b>Kleingeräte:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elektronische Feinwaage: Mettler H54: Mettler, Deutschland</li> <li>- Elektronische Feinwaage: Sartorius BP 410S, Sartorius, Göttingen</li> <li>- Elektronischer Gasdruckregler MBR 200: Bosch Wägesysteme, Jungingen</li> <li>- pH-Meter: Expandomatic IV: Beckman, USA</li> <li>- Peristaltische Schlauchpumpen: MP 5: Edmund Bühler, Tübingen;</li> <li>10200 Perpex: LKB Bromma, Schweden</li> <li>Hermle P 220, Hermle, Hvidovre, Dänemark</li> <li>Colora 3600, Colora-Messtechnik, Lorch</li> <li>- Chromatographiesäulen: Pharmacia, Uppsala, Schweden</li> <li>- Wasserbadschüttler Model 676: New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J., USA</li> <li>- Luer mit flüssigem Stickstoff zur Lagerung eingefrorener Zellen: VHC 35, Union Carbide, Chicago, USA</li> <li>- Fraktionensammler: Ultrorack, LKB Bromma, Schweden</li> <li>- Inkubationsschrank: ZPS, Edmund Bühler, Tübingen</li> </ul>

## 2.4 Software

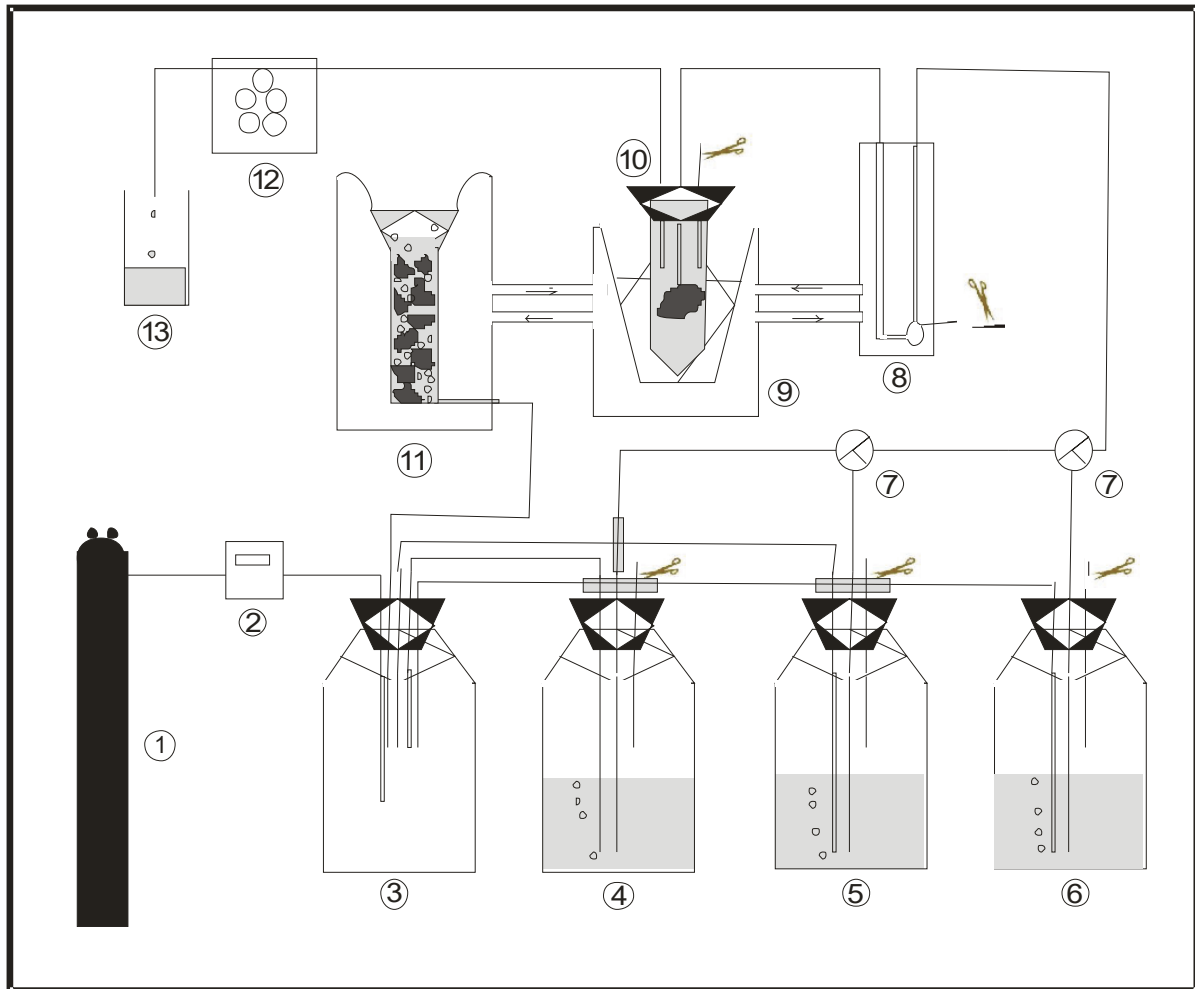
- Axiovision 3.0: Carl-Zeiss Vision GmbH, Halbergmoos
- Axioviewer 3.0: Carl-Zeiss Vision GmbH, Halbergmoos
- Corel Draw Version 11: Corel Corporation, Ottawa, Kanada
- Corel Photo-Paint Version 11: Corel Corporation, Ottawa, Kanada
- Microsoft Excel 2007: Microsoft GmbH, Verl
- Microsoft Powerpoint 2007: Microsoft GmbH, Verl
- Sarto Connect Version 3.1.2: Sartorius AG, Göttingen
- Nero Burning Rom 5.0: Ahead Software GmbH, Karlsbad
- Datenübertragungssoftware YSC01L Vers. 3.1.2; Sartorius, Göttingen
- Namewiz: Softbyte Labs, Spring Hill, USA
- pjBmp2Avi: Freeware (Autor: Paul Roberts)
- Divx 4.12: Divx Networks Inc., San Diego, USA
- Movixone 4.0: Aist Media Lab AG, Ampfing

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Isolierung verschiedener Zellarten

#### 2.5.1.1 Venuläre Endothelzellen aus Rattenherzen

Alle Teile der Perfusionsapparatur (siehe **Abb. 1**) werden bei 120°C 25 Minuten lang autoklaviert und unter größtmöglicher Beibehaltung der Sterilität zusammengebaut. Das erste Vorratsgefäß wird mit 300 ml kalziumhaltigem KHM (Zusatz von 1,25 mM CaCl) gefüllt, das zweite Vorratsgefäß mit 250 ml kalziumfreiem KHM (mit Zusatz von 10 µM Papaverin). In ein drittes Gefäß wird 35 ml der Enzymlösung für die Myokarddissoziation bei der Ratte gefüllt, weitere 15 ml der Enzymlösung verbleiben für die spätere Nachverdauung im temperierten Glastrichter. Über zwei sterile Dreiwegehähne werden die drei Gefäße zu einem speziellen Durchlauferwärmer (Temperatur bei 37°C) geleitet.



**Abb. 1:**

*Versuchsanordnung zur proteolytischen Dissoziation von Rattenherzen.*

*Bildlegende:*

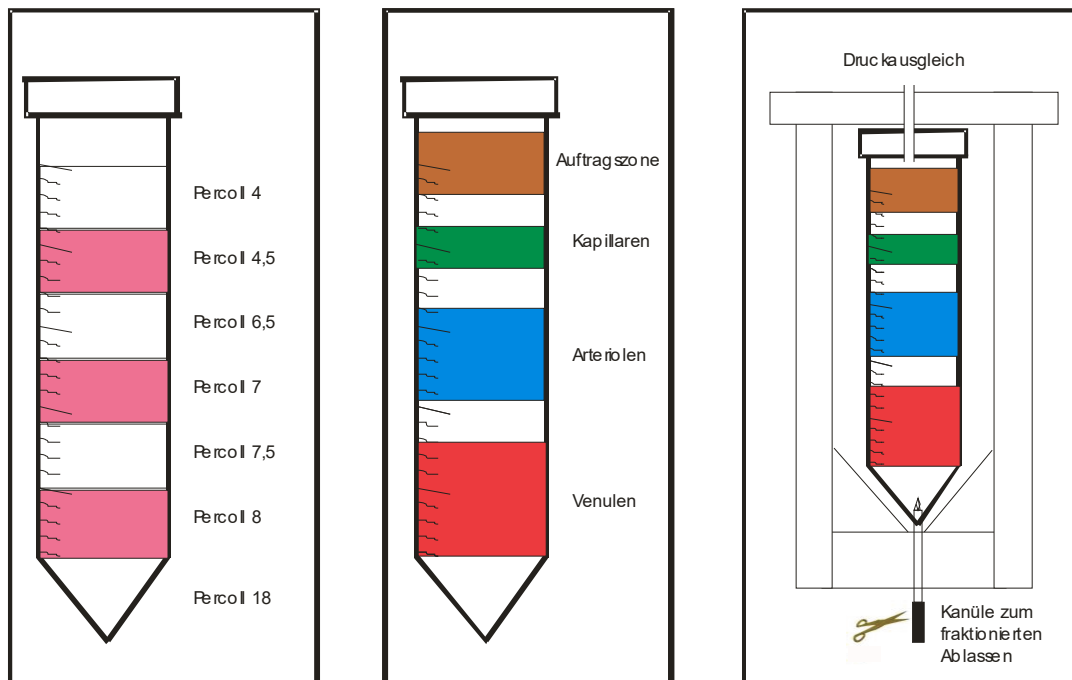
- 1) Carbogengasflasche
- 2) Druckregulator mit Sterilfilter
- 3) Gasverteilerflasche
- 4) Vorratsflasche für kalziumhaltige Perfusionslösung
- 5) Vorratsflasche für kalziumfreie Perfusionslösung
- 6) Vorratsflasche für Enzymlösung
- 7) Dreiwegehähne
- 8) Durchlauferhitzer mit Entlüftungsmöglichkeit
- 9) Temperaturregulierbares Wasserbad
- 10) Perfusionsgefäß mit darin enthaltenem Rattenherzen
- 11) Nachverdauungstrichter
- 12) Pumpe
- 13) Auffanggefäß

Durch ein elektronisches Druckregelungsgerät wird der Gasdruck konstant bei 160 mbar gehalten.

Alle Arbeitsgeräte werden autoklaviert und alle Spüllösungen sind steril. Frisch decapitierten Ratten, welchen 20 Minuten zuvor 5000 IU Fragmin subkutan gespritzt worden war, wird die Aorta durch einen kleinen Schnitt knapp oberhalb des Aortenansatzes eröffnet und eine Kanüle eingeführt. Diese Kanüle wird mit Hilfe eines Bindfadens in ihrer Position fixiert. Das Herz wird aus dem Körper entnommen und über die Kanüle am Ende des Durchlauferwärmers befestigt. Nun erfolgt die Öffnung der Dreiwegehähne für kalziumhaltiges KHM, welches solange perfundiert wird, bis das Herz gleichmäßig schlägt und möglichst vollständig blutleer erscheint. Nach dem dies der Fall ist, wird am Dreiwegehahn auf kalziumfreies KHM umgestellt, woraufhin das Herz nach kurzer Zeit die Pumpfähigkeit einstellt. Nun kann am Dreiwegehahn auf die Enzymlösung umgestellt werden, die ersten 5ml werden aber noch verworfen. Das Herz wird in ein mit Percoll-6 gefülltes Gefäß eingetaucht, welches luftblasenfrei verschlossen wird, sodass nur ein Schlauch als Abfluss offensteht. Dieser Schlauch wird in eine peristaltische Pumpe mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1ml/min. eingelegt. So wird eine gleichmäßige Perfusion erreicht, die nach 30 Minuten durch Stoppen der Pumpe und vorsichtiger Entnahme des Herzens aus dem Percoll-6-Bad beendet wird.

Das Herz wird nun auf einer sterilen Platte mit Hilfe einer autoklavierten Rasierklinge zerkleinert und zusammen mit 15 ml Enzymlösung in einen temperierten Trichter (37°C) gegeben, welcher mit sterilem Carbongas von unten durch die Engstelle derart begast wird, dass die kleinen Myokardbröckchen durch die Luftblasen an die Wand gedrückt werden. Diese Nachverdauung wird unter gelegentlicher mikroskopischer Kontrolle etwa 30-35 Minuten lang durchgeführt, danach wird der Trichterinhalt auf ein 200 µm- und danach auf ein 100 µm Filternetz pipettiert.

Die Flüssigkeit, welche die Filter passiert (normalerweise ca. 16ml) wird im Verhältnis 1:1 mit Percoll 4 gemischt und zu gleichen Teilen vorsichtig auf zwei vorbereitete Percoll-Gradienten aufgeschichtet. Diese Gradienten bestehen jeweils aus (von unten nach oben) 2,5 ml Percoll-18, 5,5 ml Percoll-8, 5,5 ml Percoll 7,5, 5,5 ml Percoll-7, 5,5 ml Percoll-6,5, 5,5 ml Percoll-4,5 und 5,5 ml Percoll-4. Das Aufschichten der Gradienten sollte 12 Stunden vorher geschehen, damit sich die einzelnen Schichten an den Übergängen vermischen können, so entstehen annähernd kontinuierliche Gradienten (siehe **Abb. 2**).



**Abb. 2:**

*Isolierung von venulären Endothelzellen aus proteolytisch dissoziiertem Rattenherzen mittels kontinuierlicher Dichtegradien a) Aufschichtung von Percoll-Lösungen verschiedener Dichte b) Verteilung von Venulen/VEC, Arteriolen und Kapillaren in den Gradienten nach Zentrifugation c) Fraktioniertes Ablassen mittels einer von unten eingestochenen Kanüle*

Die beiden Gradienten werden nun für 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, anschließend wird der Inhalt in einer speziellen Fraktionierungsvorrichtung von unten her in definierten Fraktionen abgelassen und gesammelt (siehe **Abb. 2**). Die Fraktionsgröße beträgt jeweils 5,5 ml, wobei sich in der ersten Fraktion überwiegend einzelne venuläre Endothelzellen und Kardiomyozyten befinden (letztere sterben aber innerhalb weniger Stunden ab). In der dritten Fraktion befinden sich überwiegend venuläre Gefäßfragmente, darunter venuläre Einzelzellen. Somit sind aus den Fraktionen eins bis drei Primärkulturen venulären Endothels mit einer Reinheit von 60 – 90% zu erzielen. Die einzelnen Fraktionen werden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und noch einmal bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert, danach wird der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt. Nun wird mit Kulturmedium auf 30 ml aufgefüllt und reemulgiert. Die entstandene Emulsion wird auf Kulturschälchen verteilt, wobei jeweils 2,0 ml auf ein 35 mm-Kulturschälchen entfallen.



### 2.5.1.2 Venuläre Endothelzellen aus Menschenherzen

Das folgende Protokoll basiert zum Teil auf der Dissertationsarbeit meines Arbeitsgruppenkollegen Gerd Juchem<sup>43</sup>.

Bei der Entnahme menschlicher Explantatherzen wird die Herzspitze großzügig abgeschnitten und für den Transport in eisgekühlter kardiophlegischer Lösung nach Bretschneider gelagert. Nach dem Abtrennen der Herzspitze in etwa 6-8 cm Höhe werden 2-4 epikardiale Koronararterien ausgewählt, welche ein möglichst großes Gebiet der Herzspitze versorgen und eine Perfusion eines möglichst großen Teils des Myokardgewebes ermöglichen. In die gewählten Arterien werden ca. 4 cm lange Teflonschläuche (Durchmesser jeweils 0,5-1 mm), welche über Silikonschläuche mit zwei Durchlauferwärmern verbunden sind, eingenäht. Kollateralgefäße, über die Perfusionslösung austritt, werden abgebunden, abführende Venen werden durch einen Schnitt weiter eröffnet, um eine Abflussbehinderung auszuschließen. Die Herzspitze muss nun in den temperierbaren Trichter (37°C) überführt und initial für 10 Minuten bei einem Druck von 80 mbar mit kalziumfreiem KHM perfundiert. Die sich im Trichter ansammelnde Flüssigkeit wird ständig abgesaugt. Nun wird das Präparat etwa 80 Minuten mit der Enzymlösung für die Dissoziation menschlichen Myokards perfundiert, der Druck wird hierbei schrittweise auf 40 mbar reduziert. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe wird die im Trichter anfallende Flüssigkeit ständig in den Vorratsbehälter zurückgepumpt. Die Pumpgeschwindigkeit muss hierbei der Menge der sich im Trichter ansammelnden Flüssigkeit angepasst werden.

Während der proteolytischen Dissoziation lässt sich eine Verfärbung der von den kanülierten Koronararterien versorgten Gebiete feststellen. Diese werden nun nach Beendigung der Perfusion unter Zuhilfenahme einer sterilen Schere und eines sterilen Löffels von nicht dissoziierten Gewebebezirken und bindegewebigen Anteilen getrennt und in sehr kleine Stücke zerteilt. Diese Stücke werden nun zusammen mit 50 ml frischer Proteaselösung in einen zweiten sterilen Trichter gegeben und unter gelegentlicher mikroskopischer Kontrolle analog zum Rattenversuch für etwa 90 Minuten nachverdaut. Die so gewonnene Suspension wird mit PBS verdünnt, durch 200µm-Netze filtriert, wiederum mit PBS aufgefüllt und mit Hilfe der Zentrifuge bei geringer Geschwindigkeit gewaschen. Nach dem Absaugen des Überstandes wird der Bodensatz mit derselben Menge Percoll-4 gemischt und auf insgesamt sechs Gradienten aufgeschichtet (pro Gradient etwa 15 ml Suspension aufschichten). Diese Gradienten bestehen jeweils aus (von unten nach oben) 2,5 ml Percoll-18, 5 ml Percoll-9, 5

ml Percoll-8, 5 ml Percoll 7,5, 5 ml Percoll-7, 5 ml Percoll-6,5, 5 ml Percoll-4,5 und 5 ml Percoll-4. Das Aufschichten der Gradienten sollte 12-18 Stunden vorher geschehen sein, damit sich die einzelnen Schichten an den Übergängen vermischen können, so entstehen annähernd kontinuierliche Gradienten.

Die Gradienten werden nun für 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, anschließend wird der Inhalt in der Fraktionierungsvorrichtung von unten her in Fraktionen zu je 5 ml abgelassen und gesammelt. In der ersten Fraktion befinden sich überwiegend einzelne venuläre Endothelzellen und viele Erythrozyten, in der zweiten Fraktion kleine Venulenstücke und in der dritten Fraktion noch einige Venulenstücke und Gefäßabschnitte aus dem arteriolen Gefäßabschnitt. Fraktion 4 enthält zu großen Teilen arteriolen Gefäßabschnitte. Zur Gewinnung von kapillären Endothelzellen ist die Fraktion 5 entscheidend. Die einzelnen Fraktionen werden noch zweimal gewaschen (mit PBS auf 50 ml auffüllen und bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert, danach wird der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt). Nun wird mit Kulturmedium auf 20-50 ml (je nach Zellausbeute) aufgefüllt und reemulgiert. Die entstandene Suspension kann so in Kulturschälchen ausgebracht werden. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 12 Stunden, danach alle 5 Tage.

### **2.5.1.3 Isolierung von Plättchen und PMN aus Vollblut**

Bei der venösen Blutabnahme (um eine Gerinnung zu Vermeiden wird mit 5 Vol % Citrat gearbeitet) wird der erste Milliliter verworfen werden, um Gefäßwandkomponenten in der Blutprobe weitestgehend zu vermeiden. Die Hälfte des so gewonnenen Blutes wird nun zu je 7 ml vorsichtig auf je 7 ml Polymorphoprep aufgeschichtet, welches zuvor in ein 15ml-Falcontubes pipettiert wurde. Das Gefäß wird nun 35 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Die entstandene Bande granulozytärer Zellen (im Falcontube zwischen der Markierung 8 ml und 9 ml gelegen) wird mit Hilfe einer dünnen Kanüle, welche knapp unterhalb der Bande durch die Plastikwand des Gefäßes eingestochen wurde, abgenommen (insgesamt etwa 1 ml Volumen). Thrombozytenreiches Plasma kann durch kurze Zentrifugation bei 1000 g aus Vollblut gewonnen werden, da die restlichen zellulären Blutbestandteile schneller nach unten wandern. Zur Herstellung eines Extraktes, welcher die Freisetzungsprodukte aktivierter Granulozyten und Plättchen enthält, werden diese wie oben isoliert und im Verhältnis 2 (plättchenreiches

Plasma) zu 1 (granulozytäre Bande aus Polymorphoprep) gemischt, mit ADP ( $10^{-4}$  M) und FMLP ( $10^{-4}$  M) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C gelagert. Mit einer Eppendorfszentrifuge wird die entstandene Suspension nun 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand entnommen, während das Pellet mit den zellulären Anteilen verworfen wird.

Sowohl die gewonnen PMNs wie auch die gewonnenen Thrombozyten wurden jeweils in einem Zeitraum von 2 Stunden nach Isolation verwendet.

## **2.5.2 Verschiedene Methoden zur Zellreinigung und Zellkultivierung**

### **2.5.2.1 Reinigung von diversen Endothelzellarten mit Hilfe von eingestellten Protaminchlorid-Lösungen**

Eine Schale wird sorgfältig gespült, danach wird 0,5 ml Protaminchlorid-Lösung in 1:10-Verdünnung mit Medium I hinzu gegeben und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die Protaminchlorid-Lösung vorsichtig abgesaugt und wieder Medium I zugegeben, 12 Stunden später wird die Schale mit Hilfe einer Pipette kräftig gespült, abgetötete Fremdzellen lösen sich dabei ab.

### **2.5.2.3 Konservierung gereinigter Zellen in flüssigem Stickstoff**

Um Endothelkulturen für den Einfriervorgang bereit zu machen, muss 24 Stunden zuvor ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Die Schalen müssen sorgfältig mit PBS gespült werden und danach werden sie mit Trypsin-EDTA-Lösung für einen Zeitraum zwischen 5 Minuten (Meerschwein) und 90 Minuten (Ratte) unter genauer mikroskopischer Kontrolle inkubiert. Haben sich die allermeisten Endothelzellen abgelöst, wird die Zellsuspension 1:5 mit dem Standardkulturmedium verdünnt und 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Die Sedimente werden in Einfriermedium I resuspendiert und in gleicher Weise noch zweimal gewaschen. Nach langsamen Abkühlen der Zellen im Eisbad wird durch eine einstündige portionierte Zugabe von auf 0°C temperiertem Einfriermedium II die Zellsuspension auf 1:2 verdünnt (Endkonzentration DMSO 10%). Die erhaltene Suspension wird in Cyrotubes überführt und innerhalb von drei Stunden auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff (-196°C) gekühlt, in Tanks mit flüssigem Stickstoff kann dann die Lagerung erfolgen.

#### **2.5.2.4 Revitalisierung kryokonservierter Zellpräparate**

Nach Entnahme eines Cyrotubes aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses in einem Wasserbad rasch auf 37°C erwärmt. In einem Falcontube wird die Zellsuspension 1:5 mit Standardkulturmedium verdünnt und dreimal gewaschen (Zentrifugation für jeweils 10 Minuten bei 400g mit anschließendem resuspendieren mit Kulturmedium). Anschließend erfolgt die Aussaat in Standardkulturmedium in der gewünschten Verdünnung.

#### **2.5.3 Verfahren zur histologischen Identifizierung von Endothelzellen und Perizyten**

##### **2.5.3.1 Anfertigung von Mikrotomschnitten**

Aus den zu betrachtenden Geweben wurden mit einer Rasierklinge quaderförmige Stücke in der Größe um 1 cm<sup>3</sup> ausgeschnitten. Diese werden nun auf eine dünne Messingplatte, welche zuvor für mehrere Stunden bei einer Temperatur von -80°C gelagert wurde, aufgesetzt und somit rasch gefroren. Die Stücke werden nun mit einer Rasierklinge wieder abgelöst und auf dem vorgekühlten (-20°C) Objektträger des Mikrotoms aufgesetzt, welcher zuvor dünn mit Kontaktgel beschichtet wurde. Die Standardschnittdicke lag bei 25µm.

##### **2.5.3.2 Enzymhistochemische Verfahren**

Die in der Folge beschriebenen Techniken sind sowohl auf Zellkulturen wie auch auf Myokardschnitte anwendbar. Die Präparate werden nach ausführlicher Spülung mit PBS mit verdünntem Formalin (1:10 mit PBS verdünnt) zwei Minuten inkubiert. Danach erfolgt eine erneute sorgfältige Spülung mit PBS.

Zum Nachweis von Dipeptidylaminopeptidase IV (CD26) werden 4 mg Peptid (Gly-Pro-Methoxy-β-Naphthylamid) in 20 µl Dimethylformamid gelöst und danach mit 10 ml ES (Temperatur 4°C, zuvor 4 mg Echtblausalz zugesetzt) unter größtmöglicher Lichtabschirmung vermischt. Die so erhaltene Lösung wird über einen 0,22µm-Spritzenfilter auf die Objekte

gegeben. Anschließend muss eine dreistündige Inkubation in Dunkelheit bei 4°C erfolgen. Die Färbelösung wird durch Spülung mit PBS danach wieder entfernt.

Um Alkalische Phosphatase nachzuweisen werden die Objekte mit einer Lösung aus sechs Volumenteilen Veronalpuffer, zwei Volumenteilen 3mM ASMX-Phosphat-Lösung und einen Volumenteil 3mM Fast-Blue-BB-Lösung über einen 0,22µm-Spritzenfilter bedeckt. auf das zu färbende, fixierte Präparat gegeben. Anschließend muss eine zwölfstündige Inkubation in Dunkelheit bei 4°C erfolgen. Die Färbelösung wird durch Spülung mit PBS danach wieder entfernt.

Die beschriebenen Färbungen können auch in Kombination durchgeführt werden, wobei zuerst die Dipeptidylaminopeptidasefärbung durchgeführt werden sollte.

### **2.5.3.3 Rasterelektronenmikroskopie**

Die zu untersuchenden Proben werden mit PBS zwei mal gespült und danach mit 5%igem Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,7) fixiert. Nach erneutem wiederholten Waschen mit PBS erfolgt eine Bedampfung der Proben mit Osmiumtetroxyd in einer feuchten Kammer für zwei Stunden. Nach erneutem mehrfachem Waschen mit PBS und zwischenzeitlicher Lagerung bei 4°C über 12 Stunden in PBS erfolgt nun die Entwässerung mittels einer Ethanol-Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 100% Ethanol. Es erfolgt die Trocknung der Proben mittels CO<sub>2</sub>-Begasung und die Aufbringung auf Aluminium-Objekthalter. Hier erfolgt die Aufdampfung einer ca. 15 nm dicken Goldschicht. Die Proben werden nun im Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV betrachtet.

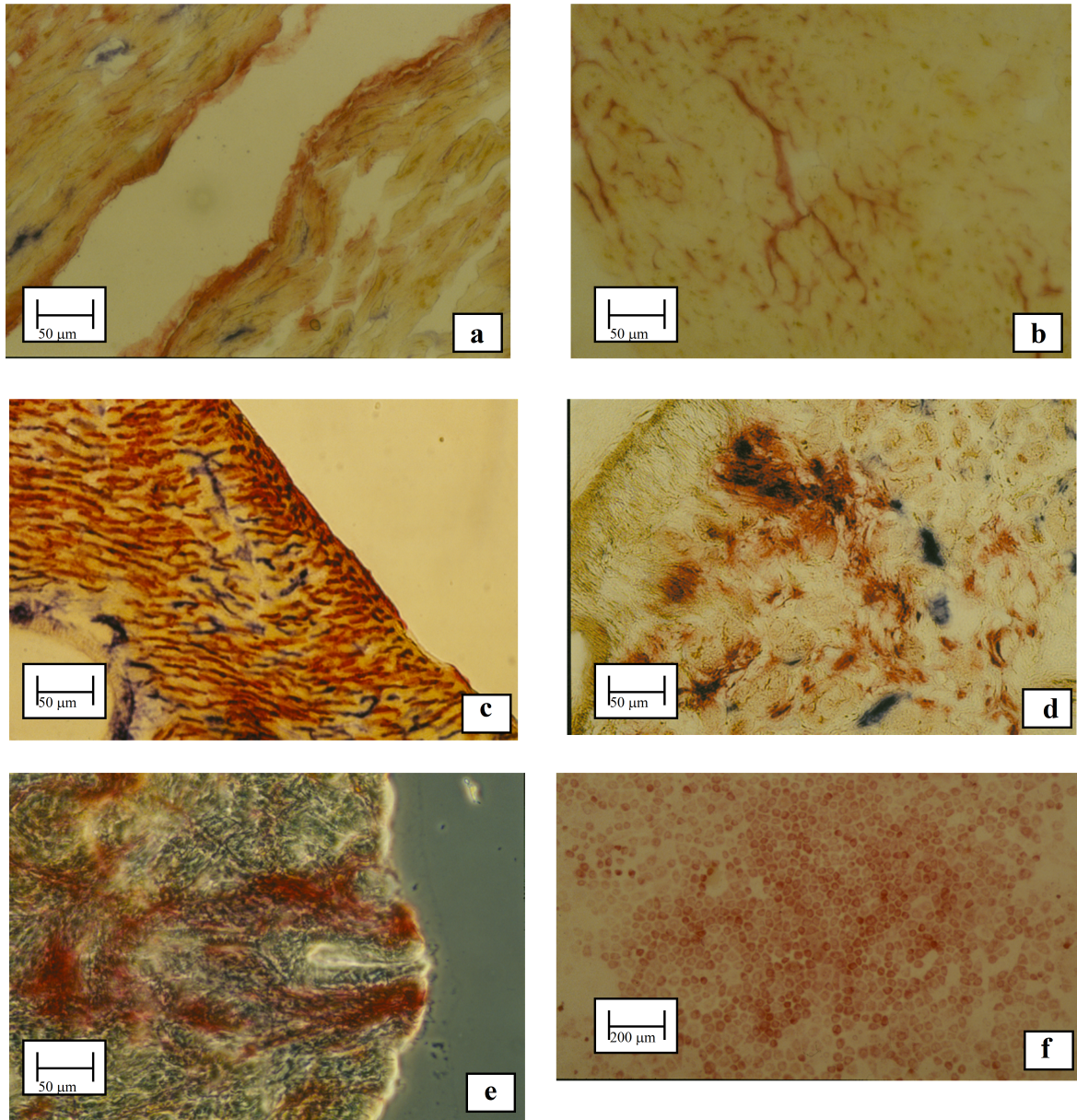
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Etablierung reiner Kulturen von venulären Endothelzellen aus Mikrogefäßen des Herzens der Ratte

#### 3.1.1 Aus Mikrogefäßen des Herzens der Ratte

Dipeptidylaminopeptidase IV hat sich in systematischen Studien als Markerenzym koronarer Venulen, alkalische Phosphatase als Markerenzym koronarer Arteriolen erwiesen<sup>88</sup>. Um diese Befunde auch für das Rattenherz zu verifizieren wurden zunächst enzymhistochemische Studien an Myokardschnitten des Rattenherzens durchgeführt. Wie **Abb.3a-c** zeigt, kommt die Dipeptidylaminopeptidase IV sowohl in kleinen postkapillären Venulen bis zu einem minimalen Durchmesser um 15-20µm wie auch in großen Sammelvenulen vor (**Abb.3a-c**). Typisch ist das Vorkommen von weitläufigen venulären Sammelsystemen mit der typischen Morphologie knollenförmiger Venenkonglomerate (**Abb.3d-e**). Der Nachweis von CD-26-positiven venulären Endothelzellen lässt sich im Lauf der enzymatischen Dissoziation über die (bei nicht vollständiger Dissoziation) erhaltenen Gefäßnetze wie auch in den selektiv erhaltenen und ausgesäten venulären Endothelzellen fortsetzen und gilt als Nachweis der Reinheit dieser Zellkulturen (**Abb. 3f**). Als Nachweis für Gefäße aus dem arteriellen Schenkel des Mikrogefäßsystems dient wie schon in der Einleitung beschrieben die enzymhistochemische Färbung auf Aktivität der alkalischen Phosphatase, in der Kultur färben sich hier die Perizyten des arteriellen Schenkels (**Abb. 4a-f**).

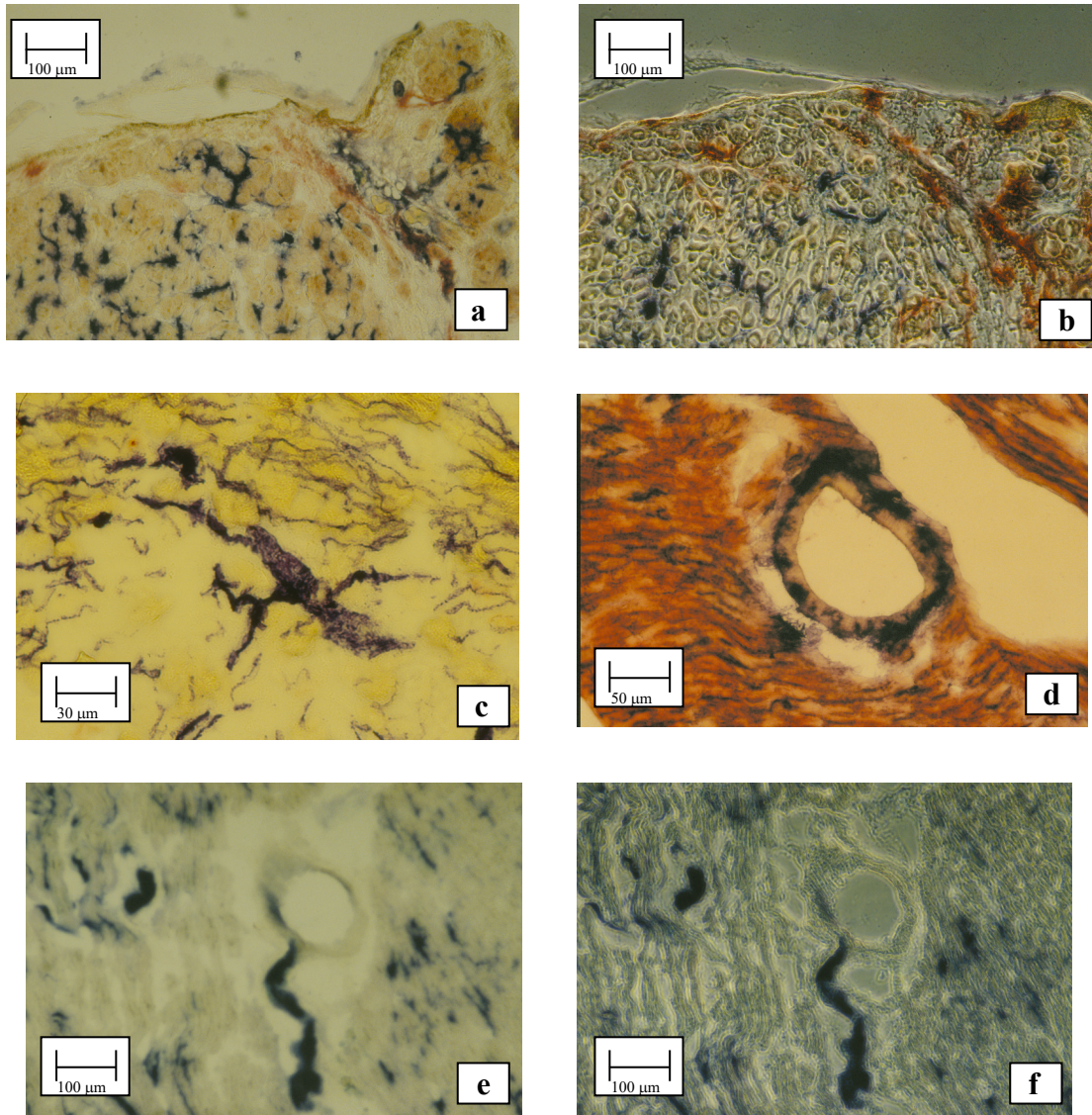
Die bei anderen Spezies durch nicht vollständige Dissoziation der Herzen mittels eines speziellen Enzymgemisches erhaltenen Gefäßbäume waren bei der Ratte wegen des nur lockeren Zusammenhaltes der Endothelzellen insbesondere im Bereich der Venulen nur mit mäßigem Erfolg zu reproduzieren.



**Abb. 3a-f:**

*Venuläre Endothelzellen aus dem Rattenherzen nach Anfärbung auf Dipeptidylaminopeptidase IV (bei **a**, **c** und **d** auch auf Alkalische Phosphatase **a**) Anschnitt einer großen Sammelvenule im Feinschnitt eines Rattenherzens **b**) kleine verzweigte Venule im Feinschnitt eines Rattenherzens **c**) viele kleine Venulen und Arteriolen, links unten mit einer größeren Arterie **d**) und **e**) knollenförmige Venulenkonglomerate **f**) reine Primärkultur von venulären Endothelzellen aus dem Rattenherzen*





**Abb. 4a-f:**

*Arteriolen aus dem Rattenherzen nach Anfärbung auf Alkalische Phosphatase (bei **a**, **b** und **d** auch auf Dipeptidylaminopeptidase IV) **a**) und **b**) kleine Arteriolen (bei **a** im Hellfeld, bei **b** im Phasenkontrast) **c**) größere Arteriole **d**) kleine Arterie mit blau angefärbten Perizyten in der Gefäßwand **e**) und **f**) Anschnitt einer größeren Arterie mit Zufluss einer blau gefärbten Arteriole (bei **e** im Hellfeld, bei **f** im Phasenkontrast*



Die proteolytische Dissoziation der Herzen verläuft ähnlich wie schon in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Nees für das Meerschwein gezeigt. Bei der Maus gelang fast in jedem Fall eine homogene Perfusion des ganzen Herzens, eine Injektion von Heparin zur Thrombenvermeidung musste deshalb im Gegensatz zu anderen Spezies nicht erfolgen. Allerdings konnte durch Zusatz von Papaverinhydrochlorid in die kalziumfreie Krebs-Henseleit-Perfusionslösung und in das Enzymperfusat eine noch geringfügig verbesserte Perfusion des Herzens erreicht werden. Nach Versuchen mit dem verwendeten Enzymgemisch wurde klar, dass im Falle der Ratte die Enzymperfusion ohne Zusatz von Trypsin erfolgen muss, dies erhöht die Ausbeute an vitalen Zellen deutlich.

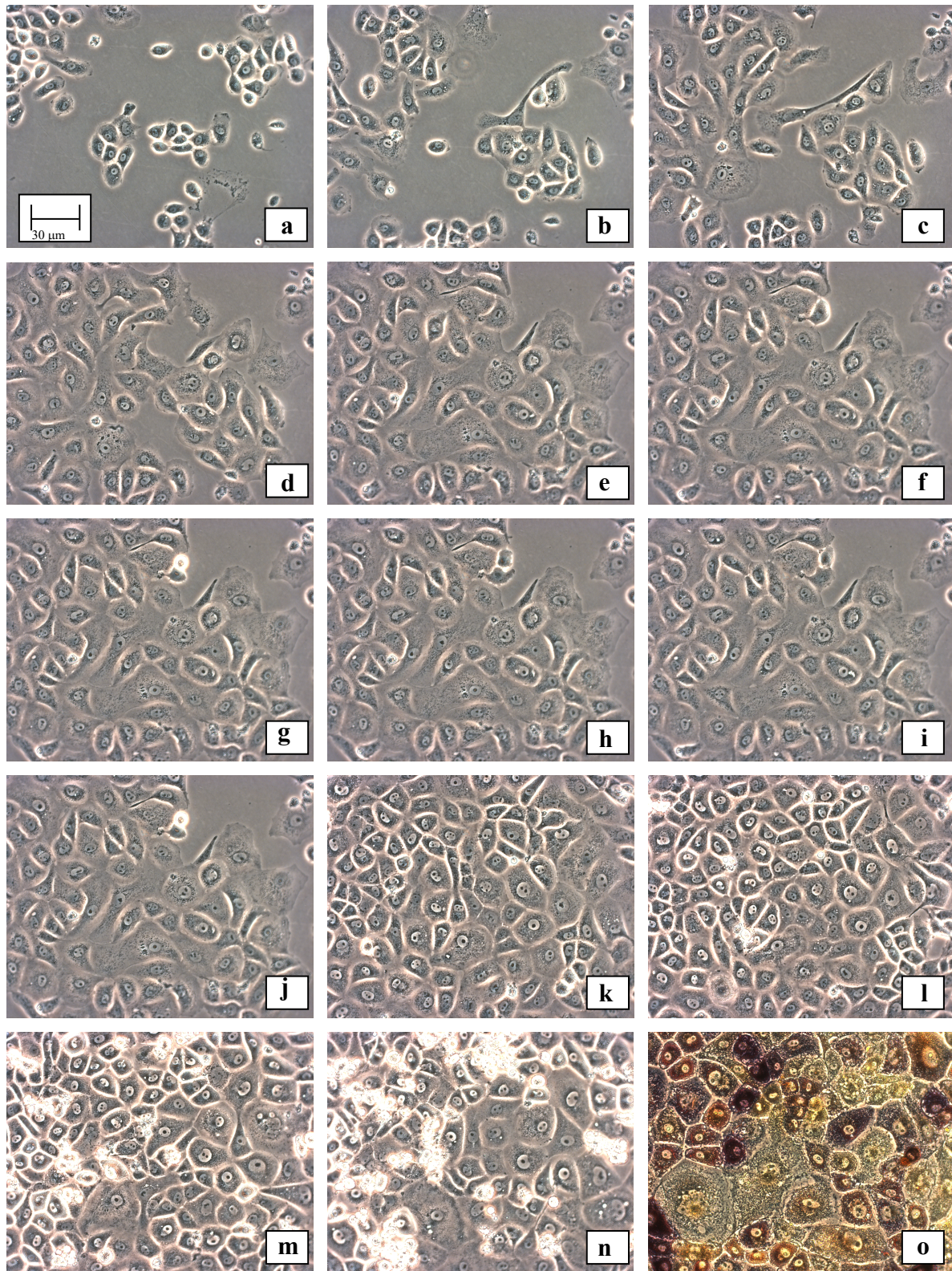
Die Enzymperfusionszeit selbst sollte bei der Ratte 30 Minuten betragen um eine gute Vorverdauung zu erzielen. In der Phase der Nachverdauung, welche wie im Methodenteil beschrieben in einem speziellen Glastrichter mit Proteaselösung erfolgt, wird durch aufsteigendes Carbogengas eine besonders schonende Dissoziation durch die geringen Scherkräfte erreicht. Es ist es besonders wichtig, durch wiederholte mikroskopische Kontrolle den optimalen Entnahmezeitpunkt nicht zu versäumen, welcher bei etwa 30-35 Minuten liegt. Im idealen Fall lassen sich dann mikroskopisch kleine (5-20 Zellen) Knollen venulären Endothels beobachten.

Entscheidend für eine optimale Auftrennung der so erhaltenen Suspension in die verschiedenen Zellfraktionen ist nun die Auftrennung mittels speziell angefertigter kontinuierlicher Dichtegradienten. Wie im Methodenteil bereits erläutert kann durch vorsichtiges Aufeinanderschichten von Percollschichten mit definierter Dichte und mehrstündiger Ineinanderdiffusion der einzelnen Schichten ein annähernd kontinuierlicher Dichtegradient erzeugt werden, auf den die Zellsuspension aufgetragen und „einzentrifugiert“ wird. Diskontinuierliche Gradienten erwiesen sich (wohl durch die hohen Scherkräfte beim Übergang zwischen den einzelnen Schichten) als Untauglich zur Fraktionierung der Zellsuspension, da sich der Anteil der vitalen Zellen nach der Aussaat nur sehr niedrig war. Durch unterschiedliche Anfärbung der einzelnen Percollschichten mittels Zugabe von Phenolrot zu jeder zweiten Schicht kann das Ergebnis der Aufeinanderschichtung und anschließenden Diffusion auch optisch kontrolliert werden. Anschließend wird das Zentrifugationstube unten angestochen und fraktioniert abgelassen. Diese Auftrennung gelingt bei der Ratte absolut vorbildlich und reproduzierbar. Die Fraktion 1 enthält immer einige venuläre Endothelzellen, die hier als Einzelzellen vorliegen. Es konnte ermittelt

werden, dass venuläre Endothelzellen eine bemerkenswert hohe Dichte besitzen, welche es ihnen erlaubt, im zentrifugierten Percollgradienten bis in den Dichtebereich des Percoll-9,5 vorzustößen. Außerdem befinden sich in der Fraktion 1 große Mengen an Kardiomyozyten, welche jedoch innerhalb weniger Stunden absterben. In den Fraktionen 2 und 3 befinden sich hauptsächlich Konglomerate venulärer Endothelzellen, verunreinigt durch wenige Arteriolenbruchstücke. Durch die Aussaat der Fraktionen 1-3 konnte in den Kulturen nach einigen Tagen ein Anteil an venulären Endothelzellen von mindestens 60%, in günstigen Fällen von bis zu 90% beobachtet werden. Dies war zu einem großen Teil auch durch die hohe Wachstumsgeschwindigkeit der Endothelzellklone bedingt, welche nicht zuerst in die Breite wandern, sondern sofort beginnen, sich zu teilen, so dass auch bei eher dünner Aussaat innerhalb von 5-7 Tagen eine konfluente Bewachsung des Schalenbodens durch eine Endothelschicht erfolgte. Diese war wie auch in vivo immer nur eine Zelle dick, übereinander wachsende Kulturen traten bei den beobachteten Endothelzellen auch nach längerer Zeit nicht auf. Die **Abb. 5** zeigt das Wachstum eines Klones venulärer Endothelzellen der Ratte, die **Abb. 3f** zeigt eine fixierte und auf CD26 angefärbte Schale mit venulären Endothelzellen derselben Spezies. Ausgiebige Vergleiche von Nährmedien zeigten, dass Standardkulturmedium (Dulbecco MEM) mit Zusatz von Albumin den eher anspruchslosen Endothelzellen aus dem Rattenherzen gute Wachstumsbedingungen bot, dies auch insbesondere im Vergleich zu anspruchsvolleren Fremdzellen.

Durch den Einsatz von Protaminchloridlösung (siehe Abschnitt 2.5.2.1) konnte der Anteil von venulären Endothelzellen noch geringfügig gesteigert werden. Protaminchloridlösung bewirkt eine relativ selektive Schädigung von nicht-Endothelzellen durch Minderung von deren Vitalität und Adhärenz (in erster Linie Perizyten). Nach dreißigminütiger Inkubation mit Protaminchloridlösung im Verhältnis 1:20 folgt eine sechsstündige Erholungsphase, welche den nur gering geschädigten Endothelzellen wieder eine feste Adhäsion an den Schalenboden erlaubt. Die deutlich stärker geschädigten Fremdzellen jedoch können durch eine nun folgende manuelle Spülbehandlung der Kulturschalen zum größten Teil abgelöst werden. Die hohe Wirksamkeit dieses Verfahrens konnte mittels erneuter enzymhistochemischer Kontrollfärbung von nun augenscheinlich ausschließlich von venulären Endothelzellen mit ihrer typischen „Pflastersteinmorphologie“ ausgefüllten Schalen bewiesen werden.

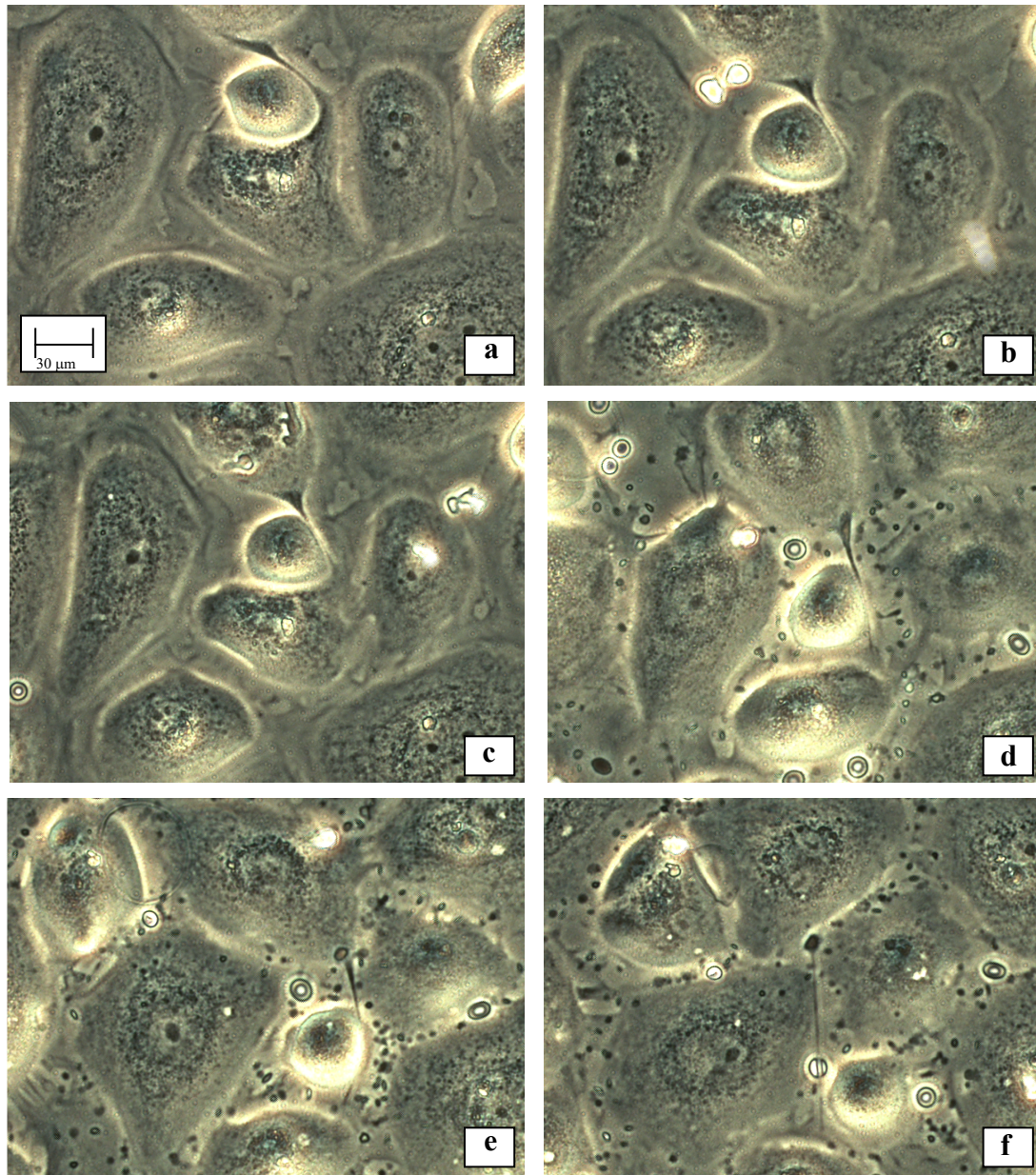




**Abb. 5a-o:**

Venuläres Endothel kurz nach Isolation aus dem Rattenherzen. Das Wachstum der Primärkultur wurde über fünf Tage hinweg beobachtet und aufgezeichnet (Bilder **a-n**), danach Fixierung der Zellen mit Glutaraldehyd und Anfärbung der Zellen mit Diaminopeptidase IV und Alkalischer Phosphatase (**5o**).





**Abb. 6a-f:**

Venuläre Endothelzellen aus dem menschlichen Herzen **a)** in Ruhe **b)** nach Zugabe von neutrophilen Granulozyten (PMNs) **c)** nach Aktivierung der PMNs mit FMLP **d)** nach Zugabe von Thrombozyten, die Interzellularspalten der Endothelzellen öffnen sich **e)** nach Zugabe von Quercetin **f)** die Interzellularspalten schließen sich wieder

Mit diesen hochgereinigten Endothelkulturen können nun die videomikroskopischen Studien zur Barrierefunktion des venulären Endothels durchgeführt (**Abb. 6**).

### **3.1.1 Aus Mikrogefäßen des menschlichen Herzens**

Im Laufe der vorliegenden Arbeit zeigte sich leider, dass das Ziel der Arbeit, die Beobachtung von Reaktionen und Interaktionen von PMNs und Thrombozyten auf mikrovaskulären venulären Endothelzellen in der simulierten Inflammation mit Hilfe des Tiermodells der Ratte nur eingeschränkt zu erreichen war. Zwar gelang im Rattensystem sowohl die Isolierung von hochreinen mikrovaskulären venulären Endothelzellen als auch die Kultivierung sehr gut. Allerdings gestaltete sich die Gewinnung von nicht-stimulierten PMNs und Thrombozyten sehr schwierig, dies mag wohl der Notwendigkeit der zentralen Blutabnahme geschuldet sein. Trotz verschiedener Blutabnahme- und Blutauflaufstechniken war trotz aller Anstrengungen die für die Experimente benötigte Bereitstellung von unstimulierten PMNs und Thrombozyten nicht sicherzustellen.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, die gewonnenen Erkenntnisse auch unter Nutzung von Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe um Prof. Nees am Physiologischen Institut der LMU auf die Gewinnung von venulären Endothelzellen aus den Mikrogefäßen des menschlichen Herzens zu übertragen. Hierzu wurden menschliche Explantatherzen aufgearbeitet, die aus den Herzchirurgischen Abteilungen des Klinikums München-Großhadern und des Universitätsklinikums Erlangen zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Perfusion und enzymatischen Desintegration des Herzens größerer Säugetiere wie des Menschen ist eine abgewandelte Technik notwendig wie sie unter Punkt 2.5.1.2 dargestellt wird. Grundsätzlich wurde nur die Herzspitze perfundiert, hierzu wurde zuerst die Klappenebene abgetrennt. Um einen möglichst großen Organbezirk perfundieren zu können, wurden die großen epikardialen Arterien aufgesucht und zur Perfusion kanüliert. Kurzschlussgefäße wurden ligiert oder bei größerflächigem Perfusataustritt mittels lokaler Hitzeapplikation koaguliert.

Nach protokollgemäßer Enzymperfusion ist das dissoziierte Gewebe schon optisch an einer hellen Verfärbung zu erkennen. Dieser Anteil der Herzspitze (meist deutlich über 50% der Gewebemenge) ist wegen der nun weichen Konsistenz leicht mittels eines scharfen Löffels nun problemlos vom unverdauten Myokard zu lösen und der Nachverdauung zuzuführen.

Die Nachverdauung muss wegen der im Vergleich zur Ratte natürlich ungleich größeren anfallenden Gewebemenge in einem größeren Trichter ausgeführt werden. Das Prinzip mit einer schonenden mechanischen Dissoziation des Gewebes durch die Scherkräfte aufsteigende Carbongasblasen bleibt unverändert. Der mit dieser Methode gewonnene weitestgehend homogene Brei aus ehemaligem Myokardgewebe wird nun über 200µm-Netze filtriert.

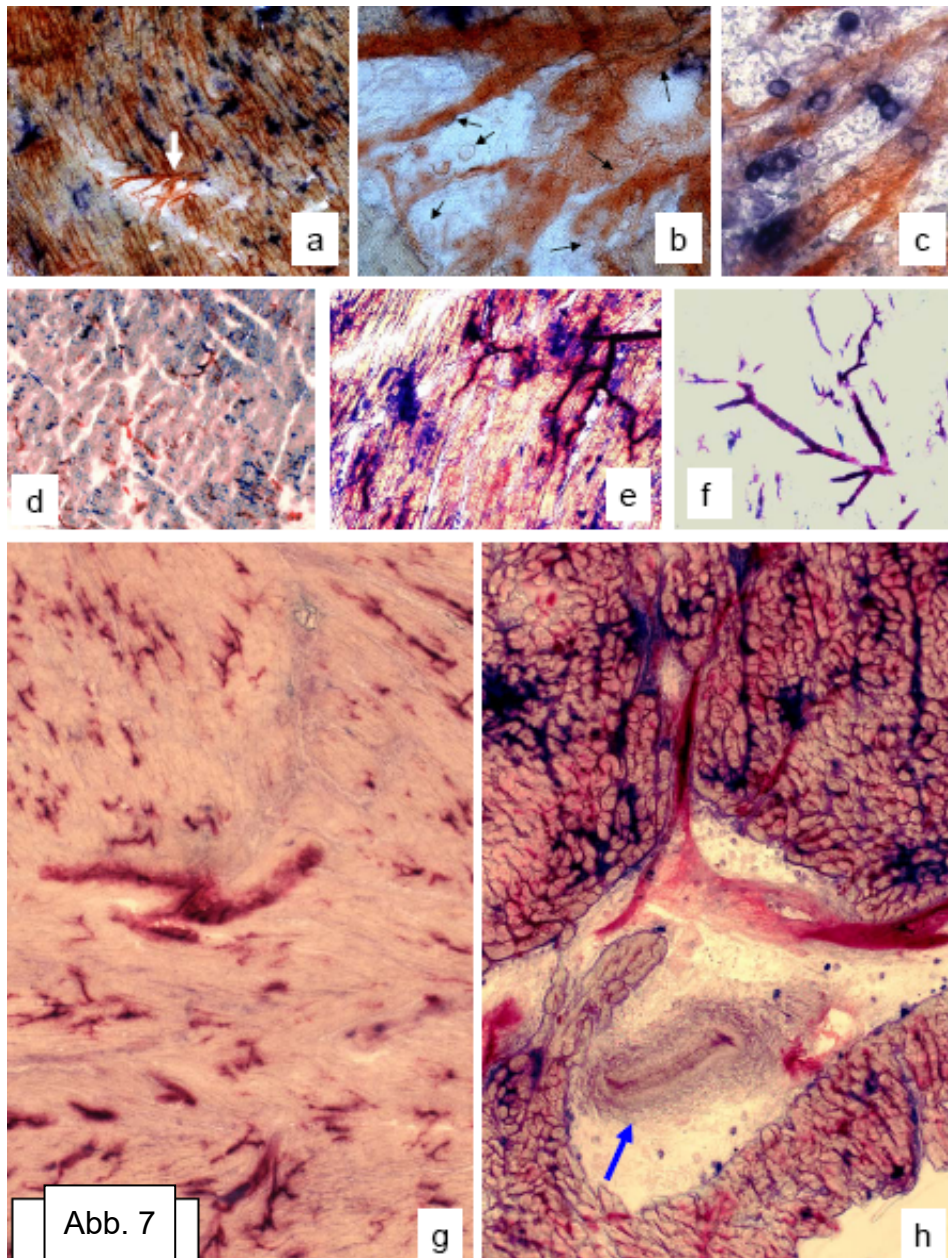
Das Filtrat kann nun, in gleichen Teilen gemischt mit 20%iger Percoll-Lösung, auf analog zur Isolationsprozedur der Ratte vorbereitete Dichtegradienten zur Zentrifugation aufgetragen werden. Die Verteilung der einzelnen Zellarten im Dichtegradienten war beim menschlichen System leicht unterschiedlich, wegen der etwas höheren Dichte der menschlichen venulären Endothelzellen waren diese nach Zentrifugation eine Fraktion tiefer als bei der Ratte anzutreffen.

Als diffizil erwies sich die Aussaatdichte der venulären Endothelzellen. Wurde eine zu dichte Aussaat ausgebracht, war zumeist eine Überwucherung der Endothelzellen durch Fremdzellen zu beobachten. Bei zu dünner Aussaat dagegen war das Endothelzellwachstum sehr langsam. Bei idealer Aussaat dagegen kann innerhalb von 10 Tagen ein konfluenter Endothelrasen mit der typischen Pflastersteinmorphologie der Endothelzellen bei nur wenigen Fremdzellen entstehen. Voraussetzung hierfür ist allerdings das richtige Kulturmedium. Die besten Ergebnisse waren mit einer Mischung aus Kulturmedium I und Kulturmedium II (siehe Punkt 2.2) im Verhältnis 1:1 zu erzielen.

Zur weiteren Reduktion der Begleitzellen und damit zur Steigerung des Anteils der venulären Endothelzellen wurde auch hier eine Nachreinigung mittels Protaminchloridlösung vorgenommen. Nach dreißigminütiger Inkubation mit Protaminchloridlösung im Verhältnis 1:20 folgt auch hier eine sechsstündige Erholungsphase, welche den nur gering geschädigten Endothelzellen wieder eine feste Adhäsion an den Schalenboden erlaubt. Die hohe Wirksamkeit zur Gewinnung weitgehend reiner Kulturen von venulären Endothelzellen wurde

wieder mittels enzymhistochemischer Kontrollfärbungen überprüft. Dies geschah analog zur Ratte bei starker Aktivität der venulären Endothelzellen in der Dipeptidylaminopeptidase IV-Färbung (und somit des Nachweises von CD26). Die Verteilung dieses Markers ist auch im histologischen Präparat aus dem menschlichen Myokard sichtbar (**Abb. 7**), zum Nachweis für Gefäße aus dem arteriellen Schenkel des Mikrogefäßsystems dient auch hier die enzymhistochemische Färbung auf Aktivität der alkalischen Phosphatase, welche sich in den Perizyten des arteriellen Schenkels findet.





**Abb. 7a-h:**

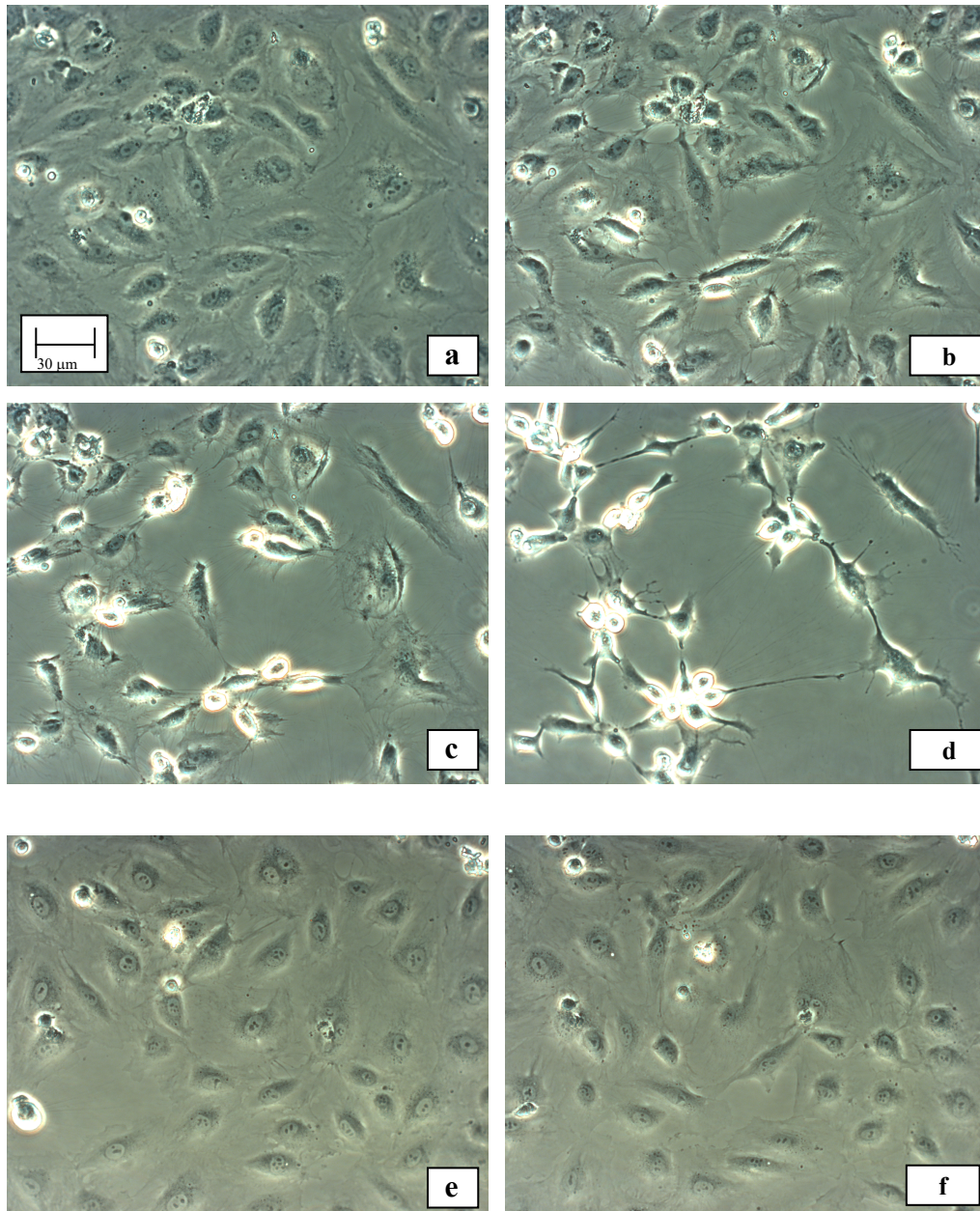
Anfärbung von simultan aktivierten Thrombozyten und PMN in Mikrotomschnitten aus dem mit Blut perfundiertem menschlichen Herzen, Aufnahmen in Hellfeld-Mikroskopie, nur Bild c) in Phasenkontrast-Mikroskopie) **a)** Zentrales Venulen-Konglomerat (Pfeil) mit zahlreichen postkapillären Zuflüssen (rot-braun) **b)** Ausschnitt aus **a)**, mit transmigrierenden PMN (Pfeile) **c)** postkapilläre Venulen (rot-braun) und blau angefärbte PMN, die spezifisch in diese Region wandern **d)** Übersichtsaufnahme mit Arteriolen (rot) und PMN (blau), welche nicht in Arteriolen, sondern in Venulenkonglomeraten (ungefärbt) akkumulieren und diese damit markieren **e)** Vergrößerungen aus **d)**, die Arteriolen imponieren dunkelrot **f)** Arteriolen (rot) und Thrombozyten (blau), welche selektiv in Arteriolen verbleiben und die (ungefärbten) Venulenkonglomerate deshalb nicht markieren **g)** unter analogen Bedingungen, aber im Beisein von 100 μM Quercetin verbleiben keine blauen Thrombozyten in den roten Arteriolen **h)** PMN (blau) emigrieren im nach Aktivierung durch FMLP aus den Venulen (rot) ins myokardiale Gewebe; in der großen Arterie (Pfeil) findet sich keine Aggregation von PMN oder Thrombozyten



## **3.2 Grundlegende methodische und apparative Entwicklungsarbeiten als Vorbereitung diskontinuierlicher und kontinuierlicher Beobachtungen von lebenden Zellsystemen von Beobachtungen bis zur Grenze der Lichtmikroskopie**

### **3.2.1 Sicherstellen möglichst physiologischer Umgebungsbedingungen für die verwendeten Zellkulturen während der mikroskopischen Betrachtung**

Bereits kleinste Änderungen der Umgebungsbedingungen führten zu einer starken negativen Beeinflussung der zu beobachtenden Zellsysteme (**Abb.8**). Um möglichst physiologische Umgebungsbedingungen zu schaffen, müssen Faktoren wie Begasung, Temperatur und Oberflächenstruktur der zu besiedelnden Gewebekulturschalen beachtet werden. Während der Versuchsreihen wird klar, dass noch weitere Effekte wie die phototoxische Wirkung der Mikroskoplichtquelle auf empfindliche Zellsysteme zu beachten sind. Selbst methodische Faktoren wie die richtige Befestigung der Zellkulturschale auf dem Mikroskoptisch oder die Frage der idealen Anordnung externer Zugabemöglichkeit von Reaktionskomponenten bzw. der Abnahme von Probevolumina aus der Kulturschale während dem Experiment hat einen bedeutenden Einfluss auf die Homöostase der zu beobachtenden Zellkultursysteme. Ferner muss selbstverständlich gerade im Bereich starker Vergrößerungen bis hin zur Grenze der Lichtmikroskopie für eine den jeweiligen Bedürfnissen angepasste gute Optik gesorgt werden.



**Abb. 8a-f:**

Endothelzellen reagieren überaus empfindlich auf Umwelteinflüsse. Die Bilder a-d zeigen Endothelzellen aus der Vena Saphena nach Inkubation mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9% NaCl), wie sie beispielsweise während Bypass-Operationen zur Suffizienzprüfung von entnommenen Beinvenen eingesetzt wird (Bilder a-d). Vom Startpunkt a) dauert es nur 5 Minuten bis zum Tod der meisten Endothelzellen (Bild d).

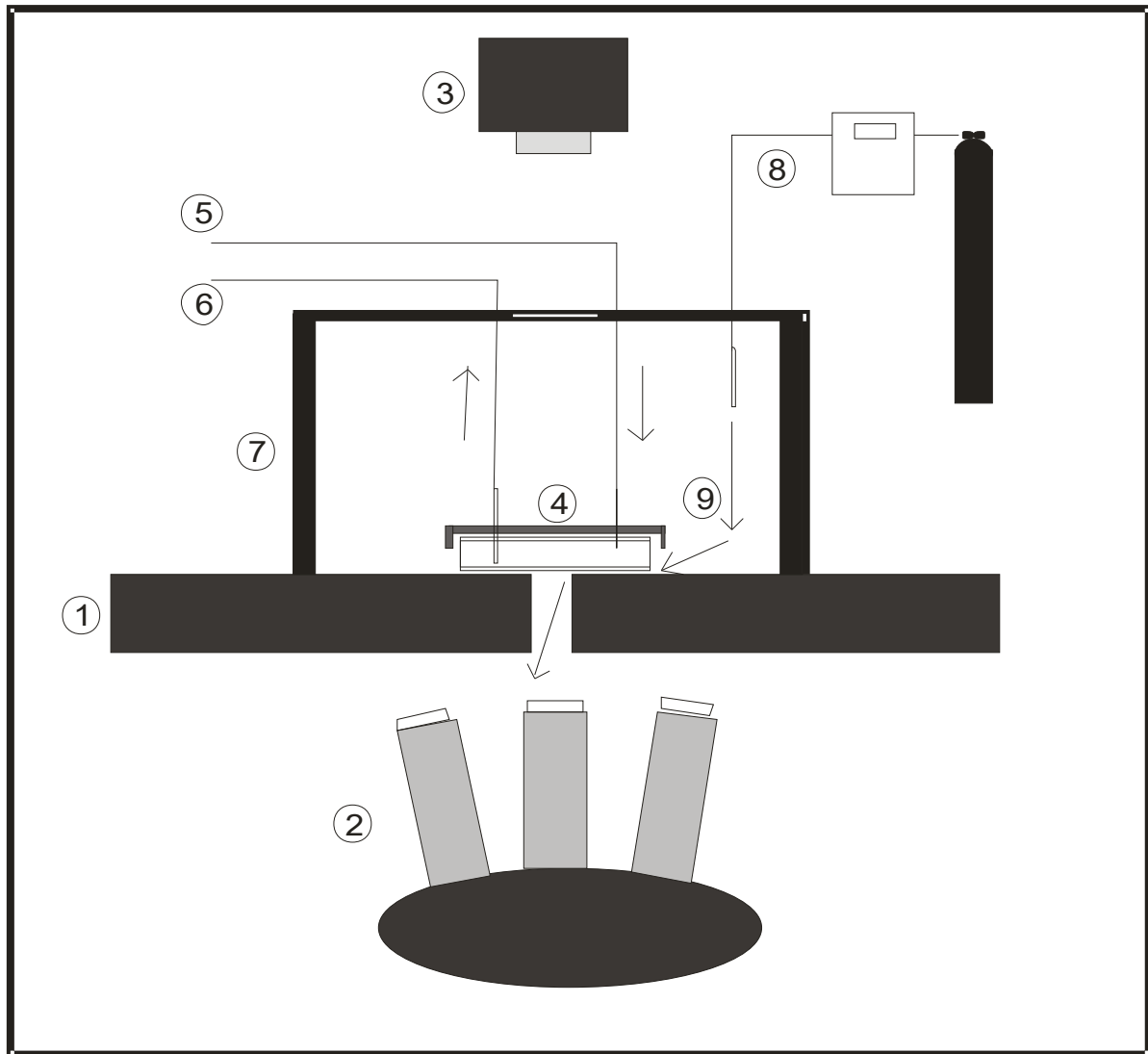
Im Kontrollversuch (Bilder e-f) wird das Kulturmedium einer Kultur von Vena-Saphena-Endothelzellen bei Bild e) durch humanes Serum ersetzt, auch nach einer Stunde (Bild f) ist bei der Kultur kein sichtbarer Schaden auszumachen

### 3.2.2 Einstellung eines konstanten CO<sub>2</sub>-Partialdruckes im Kulturmedium

Um eine Schädigung der zu untersuchenden Zellkulturen durch unphysiologische Umgebungsbedingungen zu vermeiden, ist zunächst die Entwicklung eines kontrollierbaren Inkubationssystems am Mikroskopisch notwendig, dass eine gezielte Begasung mit Carbogengas ermöglicht. Hierzu wurde eine Inkubationshaube entwickelt und gebaut, die eine Einleitung von Carbogengas (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) erlaubt; einzig möglicher Gasaustrittspunkt aus der Inkubationshaube heraus ist an der Kulturschalenunterseite entlang und am Objektiv vorbei (siehe **Abb. 9**). Eine sorgfältige Abdichtung aller Auflageflächen und Öffnungen der Inkubationshaube ist entscheidend, diese kann durch formbare wissenschaftliche Abdichtmasse (welche auch keine toxischen Stoffe ins Innere der Inkubationshaube abgibt) erreicht werden. Der pH-Wert des verwendeten Kulturmediums kann somit im physiologischen Bereich um 7,4 gehalten werden. Ein Abgleiten des pH-Wertes in den alkalischen Bereich kann bei empfindlichen Zellen (wie beispielsweise venulären Endothelzellen aus menschlichen Herzen) schon bei geringen Abweichungen nach wenigen Minuten der Zelltod nach sich ziehen. Bei mehrtägigen Versuchen ist die Zugabe hypoosmolarer Elektrolytlösung zur Kompensation der Verdunstungseffekte notwendig.

### 3.2.3 Schaffung konstanter Inkubationstemperaturen im beobachteten Mikroskopfeld

Ebenso ist für die Einhaltung konstanter Inkubationstemperaturen im Bereich der zu beobachtenden Zellen zu sorgen. Um dort die physiologische Körpertemperatur von 37,0°C zu erreichen, wird die Inkubationshaube (siehe **Abb. 9**) auf 39,5°C erhitzt, der am Unterboden der Kulturschale vorbeigeführte Carbogengasstrom hat dann im Versuchsaufbau eine gemessene Temperatur von 37,5°C. Abweichungen im Hinblick auf die Temperatur wie eine Aufbewahrung wenige Minuten bei Raumtemperatur können bei sensible Zellarten zu einer starken Irritation der Zellen und damit zu einer Verzerrung der folgenden Beobachtungen führen. Beim Aufbau der beschriebenen Versuchsanordnung ist deshalb immer eine rasche Etablierung optimaler Inkubationsbedingungen für das zu beobachtende Zellkultursystem notwendig. Hierzu gehört auch die sorgfältige Abdichtung aller Auflageflächen und Öffnungen der Inkubationshaube.



**Abb. 9:**

*Versuchsanordnung zur Sicherstellung idealer Inkubationsbedingungen für Zellkulturen während der mikroskopischen Beobachtung.*

*Bildlegende:*

1. Mikroskopisch
2. Objektivrevolver
3. Mikroskoplichtquelle
4. Kulturschale mit speziellem Schalendeckel
5. Zuleitung zur Kulturschale
6. Absaugleitung zur Kulturschale
7. Inkubationshaube
8. Carbogengaszuleitung mit Heizung
9. Abflussrichtung Carbogengas

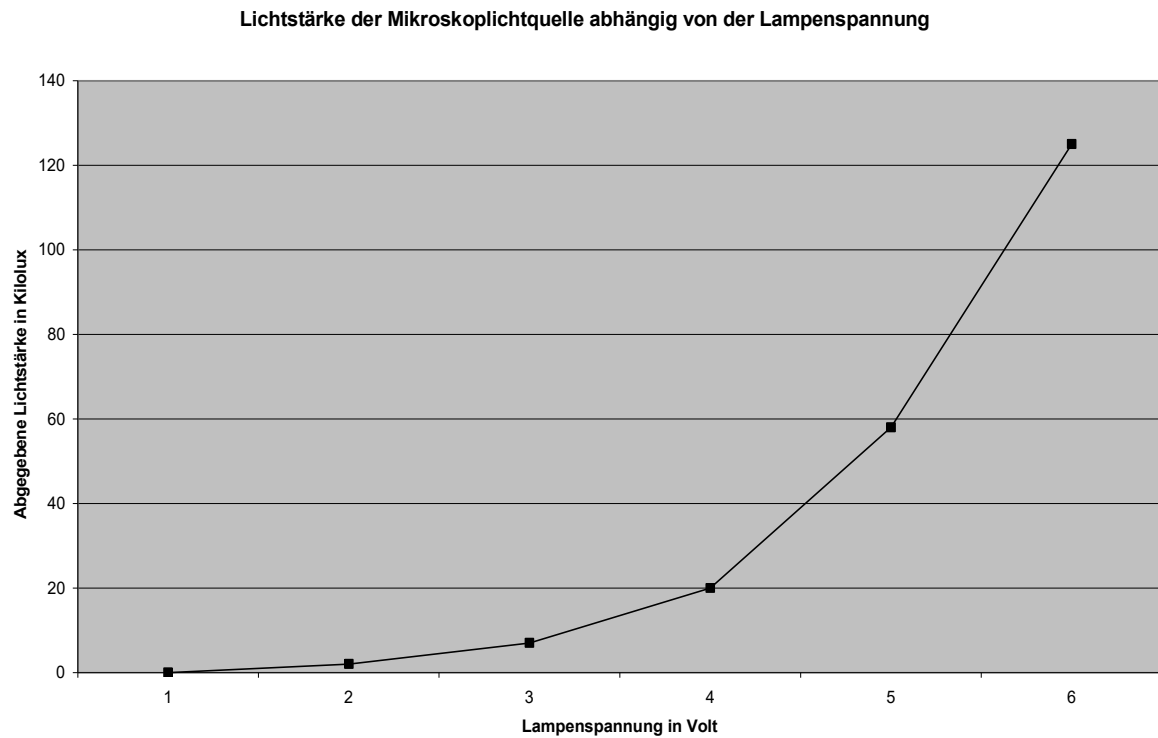
### 3.2.4 Technische Vorkehrungen zur Vermeidung phototoxischer Effekte

Insbesondere bei Langzeitbeobachtungen von Zellkultursystemen wird klar, dass eine weitere Ursache für Zellschädigungen beachtet werden muss. Die meisten beobachteten Zellsysteme

reagieren gerade in Verbindung mit Bestandteilen diverser Kulturmedien wie beispielsweise Flavinen sensibel auf phototoxische Effekte. Die phototoxischen Effekte nehmen zu, je länger die Zellen dem Licht der Mikroskoplichtquelle ausgesetzt werden. Besonders aber nehmen die Lichtschäden überproportional mit steigender Lampenspannung der Mikroskoplichtquelle zu. Messungen der von der Mikroskoplichtquelle abgegebenen Lichtstärke erklären dies (siehe **Abb. 10**). Gerade bei starken Vergrößerungen sind hohe Lichtstärken problematisch, da der Lichtstrahl auf dem beobachteten Präparat auf ein sehr kleines Feld fokussiert wird. Nach vielen systematischen Studien und Variationen des Versuchsaufbaus erweist sich eine softwaregesteuerte programmierbare Blende (Shutter) als besonders gut geeignet. Der Lichtweg wird von der Mikroskopsteuerungssoftware nur für die Dauer der Bildaufnahme freigegeben und sofort danach wieder geschlossen. Die Software-Steuerung über das Programm Axiovision 3.0 von Zeiss erlaubt eine freie Programmierung der Shuttersteuerung und der Aufnahmezyklen.

Zusätzlich können bestimmte Wellenlängen des Lichts gezielt durch farbige Linsen ausgefiltert werden. Positive Effekte sind durch gelbe Linsen zu beobachten, gerade in Zusammenhang mit den oben erwähnten Flavinen kommt es hierdurch zu deutlich geringeren phototoxischen Schädigungen. Die Gelblastigkeit der durch diese Methode gewonnenen Bildaufnahmen lässt sich in Echtzeit während der Aufnahme durch die Mikroskopsoftware korrigieren.

Die Digitalkameras der aktuellen Generation sind überaus lichtempfindlich, sodass im Vergleich zu analogen Bildgewinnungssystemen mit erheblich niedrigeren Lampenspannungen gearbeitet werden kann. Zusätzlich werden eigentlich zu schwach belichtete Aufnahmen digital nachbearbeitet, um die Helligkeit zu optimieren.

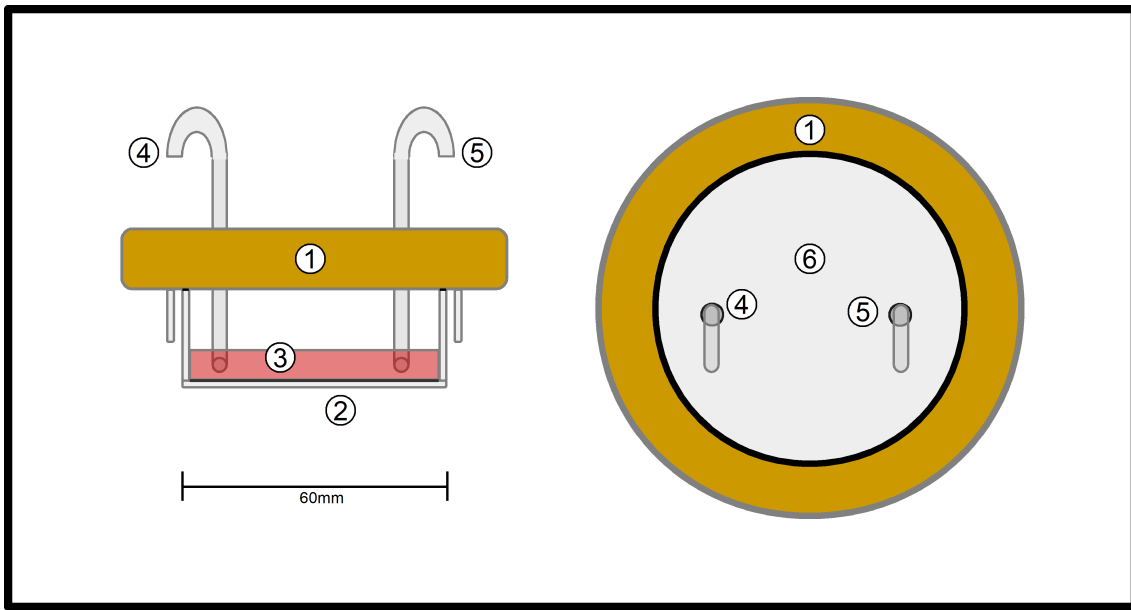


**Abb. 10:**

Von der Mikroskoplichtquelle des Axiovert 200M abgegebene Lichtstärke (in Kilolux) abhängig von der gewählten Lampenspannung. Bei steigender Lampenspannung steigt die Photonendosis exponentiell an.

### **3.2.5 Externe Zugabemöglichkeit von Reaktionskomponenten bzw. Abnahme von Probevolumina aus der Kulturschale während des Versuchs**

Die diversen Versuchsanordnungen machen es notwendig, auch während der Versuche Reaktionskomponenten in die Kulturschalen zuzugeben beziehungsweise Probevolumina abzunehmen. Dies wird durch speziell angefertigte Petrischalendeckel möglich, die in Zusammenarbeit mit der Werkstatt des Physiologischen Instituts angefertigt wurden (siehe **Abb. 11**). Der verwendete Petrischalendeckel ist zwar nicht autoklavierbar, kann aber nach sorgfältiger UV-Bestrahlung und Formalinbehandlung als weitgehend keimfrei angesehen werden. Verschiedene Voraussetzungen müssen durch die verwendete Versuchsausrüstung erfüllt werden. So muss die Kulturschale unbedingt geschlossen sein, Verdunstungseffekte lassen sonst die Osmolarität ansteigen, was in letzter Konsequenz zum Tod der Zellen führt. Weiterhin muss der Schalendeckel schwer genug sein, um ein Verrutschen während des Versuches zu verhindern. Die Zu- und Ableitung muss einen möglichst geringen Totraum aufweisen, um auch das Arbeiten mit kleinen Flüssigkeitsvolumina präzise zu erlauben. Und schließlich müssen die Zu- und Ableitung so in der Schale enden, dass vor allem bei Zuleitung möglichst wenig Verwirbelungen im beobachteten Schalenausschnitt entstehen. Die Zu- und Ableitung dürfen nicht der Schalenwand anliegen, da sonst durch Kapillarkräfte Flüssigkeit aus dem Schaleninneren austreten kann.



**Abb. 11:** Schematische Darstellung (Seitansicht und Aufsicht) des für mikroskopische Langzeitbeobachtungen lebender Zellsysteme auf dem Mikroskoptisch entwickelten Schalendeckels für Petrischalen.

Bildlegende:

- 1) Deckelumfassung aus Metall
- 2) Petrischale mit Zellkultur
- 3) Kulturmedium
- 4) Zugabeleitung
- 5) Absaugvorrichtung
- 6) Schalendeckel aus transparentem Kunststoff



### **3.2.6 Vergleich der optischen Leistungsfähigkeit verschiedener Objektive**

Da die Mehrzahl der heutigen Hochleistungs-Mikroskopobjektive (unter anderem die Objektive der Baureihen A-Plan, Achroplan, Fluar und Neofluar der Firma Zeiss) für die Beobachtung von Präparaten aus Objektträgern aus Glas optimiert wurden, ist es schwierig, ein Objektiv zu finden, dass auch eine sehr gute Abbildungsqualität von Präparaten auf transparenten Kunststoff-Flächen bietet, wie sie in den verwendeten Kulturschalenböden anzutreffen sind. Bei umfangreichen Vergleichsstudien (mit freundlicher Unterstützung der Firma Zeiss) wurden die Objektive Carl Zeiss Achrostigmat 10x / 0,25 Mikroskop  $\infty$  Objektiv 440130 Axio RMS, Carl Zeiss Achrostigmat 20x / 0,45 Axio Mikroskop  $\infty$  Objektiv 440140 RMS und Carl Zeiss Achrostigmat 32x / 0,65 Mikroskop  $\infty$  Objektiv 440150 Axio RMS der inzwischen leider eingestellte Achrostigmat-Objektivreihe als gut geeignet ausgemacht. Die meisten Aufnahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Objektiven dieser Bauserien angefertigt.

## **3.3 Möglichkeiten und Grenzen verschiedener Verfahren zur kinematographischen Abbildung lebender Zellsysteme**

### **3.3.1 Konventionelle Mikrophotographie**

An erster Stelle muss ein Verfahren gefunden werden, mit dem relativ unproblematisch und am Besten mit einer hohen Bildauflösung Einzelaufnahmen von mikroskopischen bewegten und unbewegten Objekten erstellt werden können. Mit der konventionellen Mikrophotographie steht schon seit Jahrzehnten ein einfaches und unkompliziertes Verfahren zur Verfügung, auch Bewegungsverläufe können in begrenztem Maße mit Hilfe von Bildserien dokumentiert werden. Die Bildauflösung konventioneller Photographie ist noch immer fast genauso hoch wie die der derzeit gängigen modernen Digitalkameras. Auch die Farbwiedergabe ist derjenigen von Digitalkameras zumindest gleichwertig. Es gibt eine Vielzahl von geeigneten Kameras zum Anschluss an genormte Mikroskopanschlüsse zu erwerben, teilweise zu moderaten Preisen. Generationen von Forschern sind mit diesem

Abbildungsverfahren vertraut, die Bedienung ist meist einfach und erfordert wenig Fachwissen. Die entsprechenden Kameras sind fast überall vorhanden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde an den Frontport des Axiovert 25-Mikroskops die 35 mm SLR-Kamera Ricoh XR-X-3000 über einen Fotoadapter 2,5x / T2 angeschlossen. Die Kamera verfügt über eine automatische Belichtungsfunktion, nachdem der Lichtweg auf den Frontport umgeleitet wird kann die Kamera somit mit zuverlässig optimaler Belichtung ausgelöst werden.

An Ihre Grenzen stößt die konventionelle Mikrophotographie, wenn es gilt Bewegungen und Abläufe festzuhalten. Auch muss mit meist deutlich längeren Belichtungszeiten gerechnet werden als beispielsweise bei modernen Digitalkameras. Ein weiterer Nachteil ist die aufwendige Entwicklung der Bilder, die meist auch noch extern erledigt werden muss und auch einen nicht unerheblichen Kostenfaktor darstellt. Sollen die Aufnahmen dann noch digitalisiert werden, geht beim Scan-Vorgang Bildauflösung verloren, die annähernde Gleichwertigkeit verglichen mit Digitalkameras geht dann in diesem Punkt endgültig verloren.

Das Hauptanwendungsgebiet der konventionellen Mikrophotographie im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist somit in erster Linie die Dokumentation von histologischen Schnittpräparaten, vor allem farbstarker Anfärbungen.

### **3.3.2 Echtzeit-Filmsequenzen mit analoger Videokinematographie**

Vordringliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist jedoch ein Verfahren, mit dem in erster Linie dynamische zelluläre Prozesse in Filmsequenzen, vor allem Zeitrafferfilmsequenzen abgebildet werden können. Ein solches Verfahren ist die analoge Videokinematographie, bei der eine CCD-Videokamera und ein analoger Videorekorder bzw. ein analoger Videozeitrafferrekorder zur Bildgewinnung eingesetzt werden.

An das Mikroskop Axiovert 35 wurde mittels eines C-Mount-Gewindes die CCD-Farb-Videokamera MC-1002 angeschlossen. Die Auflösung der Kamera beträgt 330 Linien horizontal und 575 Linien vertikal bei 756 x 581 Bildelementen, die Empfindlichkeit der Kamera wird vom Hersteller mit 25 Lux angegeben. Angeschlossen wurde die Kamera über einen 18-poligen Lemos-Stecker an den Camera-In-Eingang der zugehörige Steuereinheit (CCU-1002). Über den Video-Out-Ausgang der Steuereinheit konnte nun mittels BNC-

Anschlusskabel die Video-In-Buchse des analogen Zeitraffer-Videorecorders AG-6720A angeschlossen werden. Der Video-Out-Anschluss des Videorecorders wurde mit dem Sony PVM 14420M-Monitor verbunden, um parallel zur Aufnahme den gefilmten Bereich beobachten zu können.

Der Zeitraffer-Videorekorder AG-6720A erlaubt sowohl Aufnahmen in Normalzeit (mit 25 Bildern pro Sekunde) als auch Zeitraffer-Aufnahmen mit einer maximalen Raffung von 1:160 (führt beispielsweise bei zu einer Filmsequenz von einer Stunde Dauer bei einem gefilmten Zeitraum von 160 Stunden). Der Grad der Zeitraffung kann in 10 definierten Stufen gewählt werden. Die Horizontalauflösung des Rekorders liegt bei Aufnahme im VHS-Modus bei 240 Zeilen, bei Aufnahme im S-VHS-Modus bei 400 Zeilen.

Der große Vorteil dieses Verfahrens liegt neben seiner Verbreitung in seinem moderaten Preis, seiner einfachen Bedienung und vor allem in seiner Fähigkeit, bewegte Vorgänge relativ unproblematisch aufzuzeichnen. Gerade bei Vorgängen, die am besten in Echtzeit aufgezeichnet werden, ist die Videokinematographie bis heute nicht zu ersetzen. Auch bei Zeitrafferaufnahmen kann mit speziellen Videorekordern ein gutes Ergebnis erzielt werden. Als Nachteil in Kauf genommen muss allerdings die niedrige und nicht zu steigernde Bildauflösung des Videoverfahrens, bedingt durch das starre Korsett der weltweit gültigen Videostandards. Weitere Auflösungsverluste ergeben sich bei der Digitalisierung von Videoaufnahmen, zudem wird dafür zusätzliche Hardware benötigt.

Alle schnell ablaufenden Vorgänge, wie beispielsweise das Schlagen von Kardiomyozyten (siehe **Abb. 12**) oder die Reinigung von Mischkulturen mit eingestellten Protaminchlorid-Lösungen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch mit analoger Videokinematographie gefilmt und anschließend mit Hilfe einer PCI-Steckkarte für den Personal Computer („Frame-Grabber-Karte“) digitalisiert.



**Abb. 12a-b:**

Kardiomyozyt kurz nach Isolation aus dem menschlichen Herzen, nach Adrenalinzugabe spontane Kontraktionen **a)** Kardiomyozyt entspannt **b)** Kardiomyozyt kontrahiert

### **3.3.3 Echtzeit-Filmsequenzen mit digitaler Videokinematographie**

Da die Bildauflösung der mit Hilfe des analogen Videorekorders erhaltenen Videosequenzen für viele Fragestellungen noch nicht den gewünschten Qualitätsstandards entspricht, war es nahe liegend, mit einem digitalen Videorekorder zu arbeiten. Diese Videorekorder erlauben es, die Aufnahmen (auch Zeitrafferaufnahmen) auf herkömmlichen S-VHS-Videobändern digital zu speichern. In der Theorie würde es auf diesem Wege ermöglicht, über einen entsprechenden digitalen Ausgang die aufgenommenen Filme ohne Verlust an Auflösung oder Bildschärfe auf den Personal Computer zu übertragen.

Für Aufnahmen mit dem digitalen Zeitraffer-Videorekorder D-TL 1 wurde die unter 3.3.2 beschriebene Anordnung verwendet, jedoch wurde die Kamerasteuereinheit an die Camera-In-1- Buchse des D-TL 1 angeschlossen. Der Monitor wurde an den Recorder über dessen Video-Out-Buchse angeschlossen.

Der digitale Zeitraffer-Videorekorder D-TL 1 erlaubt wie der analoge AG-6720A sowohl Aufnahmen in Normalzeit (mit 25 Bildern pro Sekunde) als auch Zeitraffer-Aufnahmen, hier jedoch mit einer maximalen Raffung von 1:320 (führt beispielsweise bei zu einer Filmsequenz von einer Stunde Dauer bei einem gefilmten Zeitraum von 320 Stunden). Der Grad der Zeitraffung kann in 15 definierten Stufen gewählt werden. Die Horizontalauflösung des Recorders liegt bei Aufnahme im Modus HIGH bei 520 Zeilen. Der Recorder wurde ausschließlich im S-VHS-Modus betrieben.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode, mit Hilfe einer PCI-Steckkarte das ausgegebene Bildsignal direkt vom S-VHS-Ausganges des Rekorders in Echtzeit auf den Personal Computer zu übertragen, ermöglicht aber ebenfalls eine verlustfreie Übertragung des auf dem Videoband gespeicherten Filmes, sowohl beim analogen wie auch beim digitalen Videorekorder. Somit hat der merklich teurere digitale Videorekorder gegenüber dem analogen Videorekorder (sofern dieser ebenfalls im höherauflösenden S-VHS-Modus betrieben werden kann) keine nutzbaren Vorteile mehr aufzuweisen.

### **3.3.4 Zeitrafferdokumentation zellulärer Wechselwirkungen durch computergestützte Aufnahmeverfahren sowie Weiterverarbeitung des gewonnenen Datenrohmaterials**

Die bisher beschriebenen Bildgebungsverfahren erweisen sich aber noch dazu ungeeignet, Zeitrafferaufnahmen zellulärer Vorgänge in hoher Detailauflösung zu gewinnen. Deswegen war es nötig, einen neuen Ansatz zu entwickeln, der weiterhin auch eine einfache Weiterverwertung und Bearbeitung der erhaltenen Bild- und Filmdokumente via Personal Computer erlaubt.

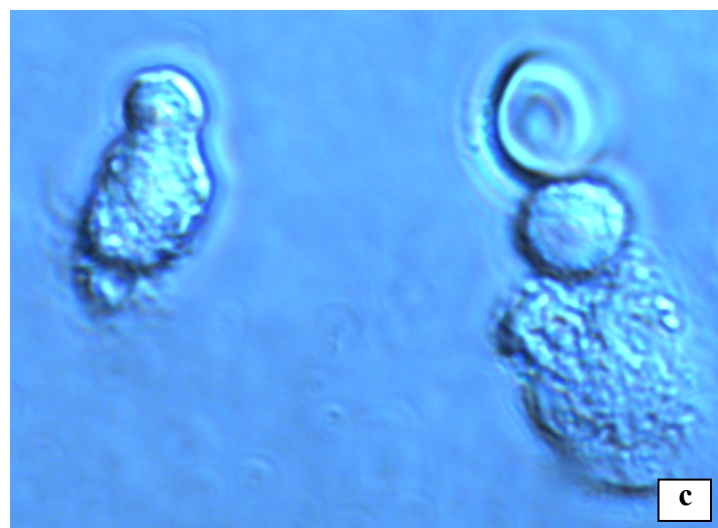
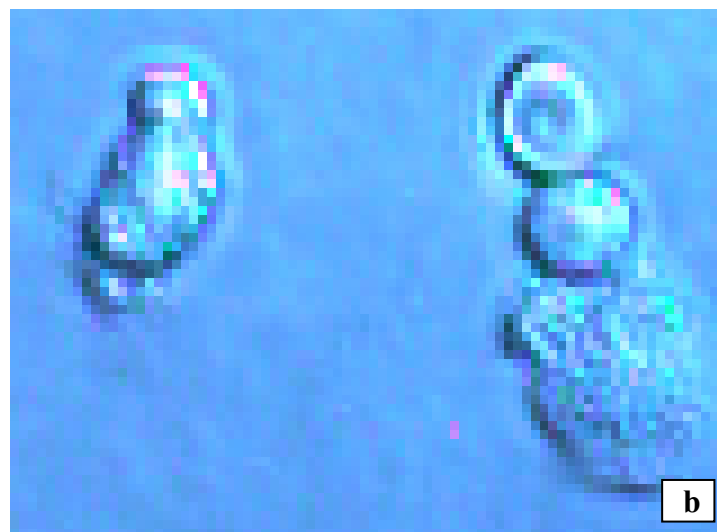
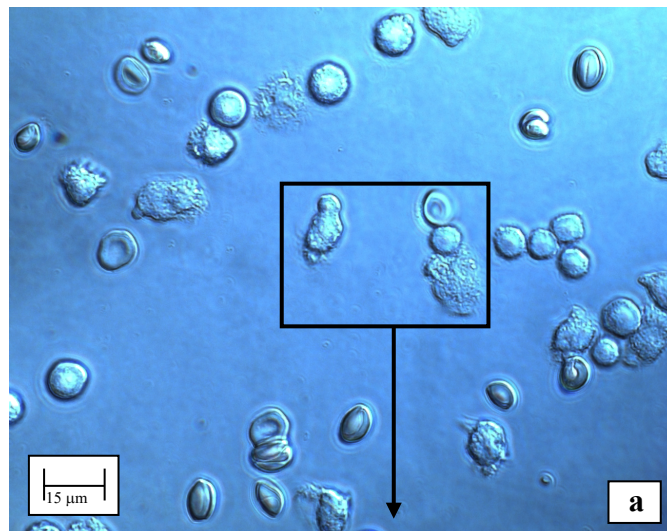
Für computergestützte Bildaufnahmen wurde ein System der Firma Zeiss, bestehend aus dem voll computersteuerbaren Mikroskop Axiovert 200M, der Kamera AxioCam HRC und der Software Axiovision 3 verwendet. Die Basisauflösung der Kamera beträgt 1300 x 1030 Pixel (Chipfläche 8,7 mm x 6,9 mm bei einer Pixelgröße von 6,7  $\mu\text{m}$  x 6,7  $\mu\text{m}$ ). Über ein Glasfaserkabel (max. Übertragungsrate von Daten oder Steuersignalen 200 Mbit/s) wurde die Kamera über eine PCI-Einsteckkarte mit dem Computer verbunden. Die weitere Kamerasteuerung erfolgte über die Axiovision 3 Software.

Die Auflösung jedes Einzelbildes liegt bei 1300x1000 Pixel, es wurden sowohl Einzelbilder wie auch Bildstapel angefertigt. Die Belichtungszeit lag beim Filmen von langsamen Prozessen (beispielsweise Vorgängen in Zellkulturen) bei bis zu 1,5 Sekunden, somit konnte die Lampenspannung auf unter 5 Volt reduziert werden. Bei schnelleren Prozessen (beispielsweise Beobachtung freischwimmender Blutzellen) wurde die Belichtungszeit auf bis zu 0,05 Sekunden reduziert, die Lampenspannung musste auf 12 Volt erhöht werden. Bei schnelleren Prozessen wurde im Rahmen der Aufnahme von Bildstapeln ein Bildabstand von 3 Sekunden gewählt, bei Versuchen wie der Aussaat von gereinigten venulären Endothelzellen wurde ein Bildabstand von bis zu 120 Sekunden verwendet.

Mit dieser Anordnung ist es möglich, sowohl Einzelbilder bis zu einer Auflösung von 3900x3090 (**Abb.13**) anzufertigen (diese Bildauflösung entspricht annähernd der Auflösung der konventionellen Mikrophotographie), als auch Filmsequenzen und Zeitrafferfilmsequenzen in hoher Auflösung zu erhalten. Störend ist allein, dass es zum heutigen Zeitpunkt mit den marktüblichen Komponenten noch nicht möglich ist, Echtzeitfilme mit beispielsweise 15 Aufnahmen pro Sekunde (soviel ist nötig, damit das menschliche Auge den Film nicht als ruckelnde Aneinanderreihung von Einzelbildern, sondern als Film wahrnimmt) in hoher Auflösung zu erhalten (siehe **Abb. 14**). Dieser

Missstand wird allerdings mit Sicherheit in wenigen Jahren behoben sein. Einstweilen muss aber bei Echtzeitaufnahmen noch auf die analoge Videotechnik zurückgegriffen werden.

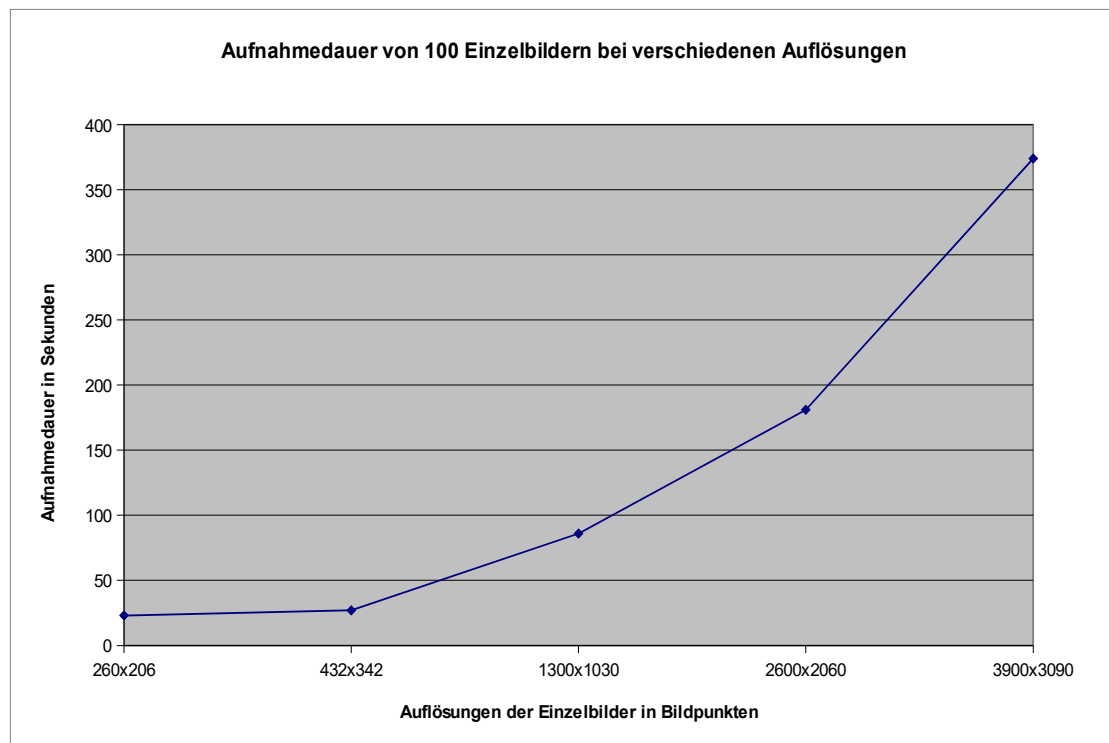
Mit Hilfe der Mikroskopsteuerungs-Software ist es möglich, Faktoren wie Bildabstand, Bildauflösung und Objektivauswahl auch während der Aufnahmesequenzen automatisch zu ändern. Dasselbe ist unter anderem auch für Lichtstärke, Belichtungszeit und Blenden möglich, so kann die Lichtbelastung (siehe 3.2.4) der Zellsysteme deutlich reduziert werden. Korrekturen der Farbmischverhältnisse können (allerdings nur in rudimentärer Form) schon während der Aufnahme in Echtzeit von der Software berechnet werden.



**Abb. 13a-c:**

Granulozytenpräparat unter dem Mikroskop **a)** in Übersichtsaufnahme **b)** Ausschnittsvergrößerung aus der Übersichtsaufnahme in der Auflösung 260x206 Bildpunkte **c)** in der Auflösung 3900x3090 Bildpunkte





**Abb. 14:**

Aufnahmedauer von 100 Einzelbildern bei verschiedenen Auflösungen mit dem Axiovert 200M- /AxioCam-System. Man erkennt wegen der ansteigenden Datenmengen bei höheren Auflösungen eine deutlich langsamere Aufnahmegeschwindigkeit

Da die erhaltenen Bild- und Filmdokumente ja schon in primärer Form digitalisiert auf dem Personal Computer vorliegen, ist auch kein Qualitätsverlust durch eine eventuell notwendige Digitalisierung mehr zu befürchten. Aus einer Aufnahmesequenz entstehen Einzelbildstapel, die Einzelbilder lassen sich entweder direkt in sämtlichen üblichen Computerapplikationen zu Präsentationen, Veröffentlichungen oder anderen Zwecken einsetzen, oder es können auch noch Faktoren wie Farbgebung, Kontrast, Helligkeit mit leistungsfähigen Bildbearbeitungsprogrammen wie Adobe Photoshop optimiert werden.

Um die Einzelbildstapel zu Filmsequenzen zu verbinden, wurden sie mittels der Software Bmp2Avi in das gängige AVI-Filmformat überführt; in diesem Format werden die Einzelbilder aneinander gefügt und mit einer Geschwindigkeit von 20 Einzelbildern pro Sekunde abgespielt. Diese Software erlaubt es auch, die gerade bei Aufnahmen mit hoher Auflösung überaus umfangreichen Datenpakete durch zwischengeschaltete so genannte Codecs bei der Filmgenerierung zu verkleinern. Die Datenmenge der Filmsequenzen kann so gegenüber der Datenmenge der addierten Einzelbilder mit Hilfe des effektivsten Codecs Divx um den Faktor 100 verkleinert werden, die Qualitätseinbußen der fertigen Filmsequenzen sind gering, die Arbeit mit den Filmsequenzen ist nun aber praktikabel. Eine Nachbearbeitung der Filmsequenzen bezüglich Faktoren wie Farbgebung, Vertonung, Schnitt und Untertitelung ist mit Programmen wie Adobe Premiere möglich. Die Wiedergabe der Filmsequenzen kann mit jeder gängigen Videoabspielsoftware erfolgen. Natürlich können auch die Filmsequenzen z.B. zu Präsentationszwecken nun in die gängigen Applikationen übernommen werden.

Zur Bearbeitung und Komprimierung der unter Punkt 3.3.2 und 3.3.3 erstellten Videosequenzen werden die Videofilme mittels einer gängigen Videosteckkarte für den PCI-Steckplatz des Personalcomputers über den S-VHS-Ausgangs des Videorekorders durch die Aufzeichnungssoftware Movixone gesichert. Danach erfolgt analog die Komprimierung durch den Divx-Codec.

Es wurden neben zahlreiche Filmsequenzen mit venulären Endothelzellen aus dem Herzen der Ratte und des Menschen und deren Reaktion auf künstlich herbeigeführte entzündliche Reaktionen angefertigt. Daneben erfolgten auch Versuche und Filmsequenzen mit anderen Zellsystemen, die nach Protokollen meiner Arbeitsgruppenkollegen isoliert und kultiviert wurden. So erfolgte die Beobachtung von Endothelzellen aus den kardialen Arteriolen des menschlichen Herzens, bovinen kardialen Endothelzellen, Endothelzellen aus der menschlichen Vena Saphena, Perizyten mikrovaskulären Ursprungs, subendothelialen perizyten-ähnlichen Zellen aus der Vena Saphena und Kardiomyozyten..

### **3.4 Anwendungen: Reaktionen und Interaktionen von PMN und Thrombozyten auf mikrovaskulären venulären Endothelzellen in der simulierten Inflammation**

#### **3.4.1 Permeabilitätsänderungen des venulären Endothels als Folge einer Inflammation oder einer phototoxischen Schädigung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Einschätzung der inflammatorischen Potenz einzelner Faktoren und Faktorenkombinationen, insbesondere von zellulären Blutbestandteilen und Mediatoren auf eine konfluente Schicht aus venulären Endothelzellen untersucht werden. Ebenso sollte auch die Wirksamkeit protektiver Substanzen eingeschätzt werden. Generell kann gesagt werden, dass sich die kultivierten venulären Endothelzellen aus dem Herzen des Menschen und auch der Ratte, im Gegensatz zum arteriellen Endothel, als überraschend reagibel und kontraktile erwiesen und somit eine sehr aktive Rolle in der Regulierung ihrer Interzellularspalten einnehmen. Gleiches gilt für die Anheftung und Diapedese der PMN, welche durch die venuläre Endothelzelle gesteuert wird. Auch Stressoren wie phototoxische Schädigung (siehe Punkt 3.2.4) führen über eine Schädigung der Zellen zur Öffnung der Interzellularspalten und damit zur Erhöhung der Permeabilität. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten hierzu keine quantitativen Studien, vielmehr wurde die Methode der Zeitraffer-Videomikroskopie zur Dokumentation eingesetzt.

#### **3.4.2 Isolierung von PMN und Thrombozyten sowie deren Aktivierung durch Entzündungsmediatoren**

Um den Einfluss zellulärer Blutbestandteile auf die Permeabilität in den kardialen Venulen zu untersuchen, ist zuallererst eine schonende Isolation von möglichst unstimulierten Thrombozyten und PMN aus Vollblut notwendig. Welche Schwierigkeiten sich hier ergeben können, wurde anhand des Tiermodells der Ratte unter Punkt 3.1.1 beschrieben. Der Vorteil des menschlichen Systems liegt neben der leichten Verfügbarkeit von Vollblut in der leichten und kontrollierten peripheren Abnahme. Wichtig ist hier insbesondere, den ersten Milliliter der Blutprobe zu verwerfen, da die sonst mit abgenommenen Gefäßwandkomponenten zu einer vorzeitigen Aktivierung der Blutbestandteile führen können. Als schonend und damit sinnvoll hat sich eine Separation der PMN durch Zentrifugation auf Polymorphoprep (siehe Punkt 2.5.1.3) erwiesen, auf diese Weise kann eine sehr reine PMN-Fraktion gewonnen

werden. Zur Gewinnung von thrombozytenreichem Plasma reicht dagegen eine normale Zentrifugation von Vollblut bei 1000 g. Bis zur Verwendung der isolierten PMN und Thrombozyten sollte erfahrungsgemäß die Zeit von 2 Stunden nach Blutabnahme nicht überschritten werden, ansonsten erfolgt eine vorzeitige Stimulation dieser Blutbestandteile.

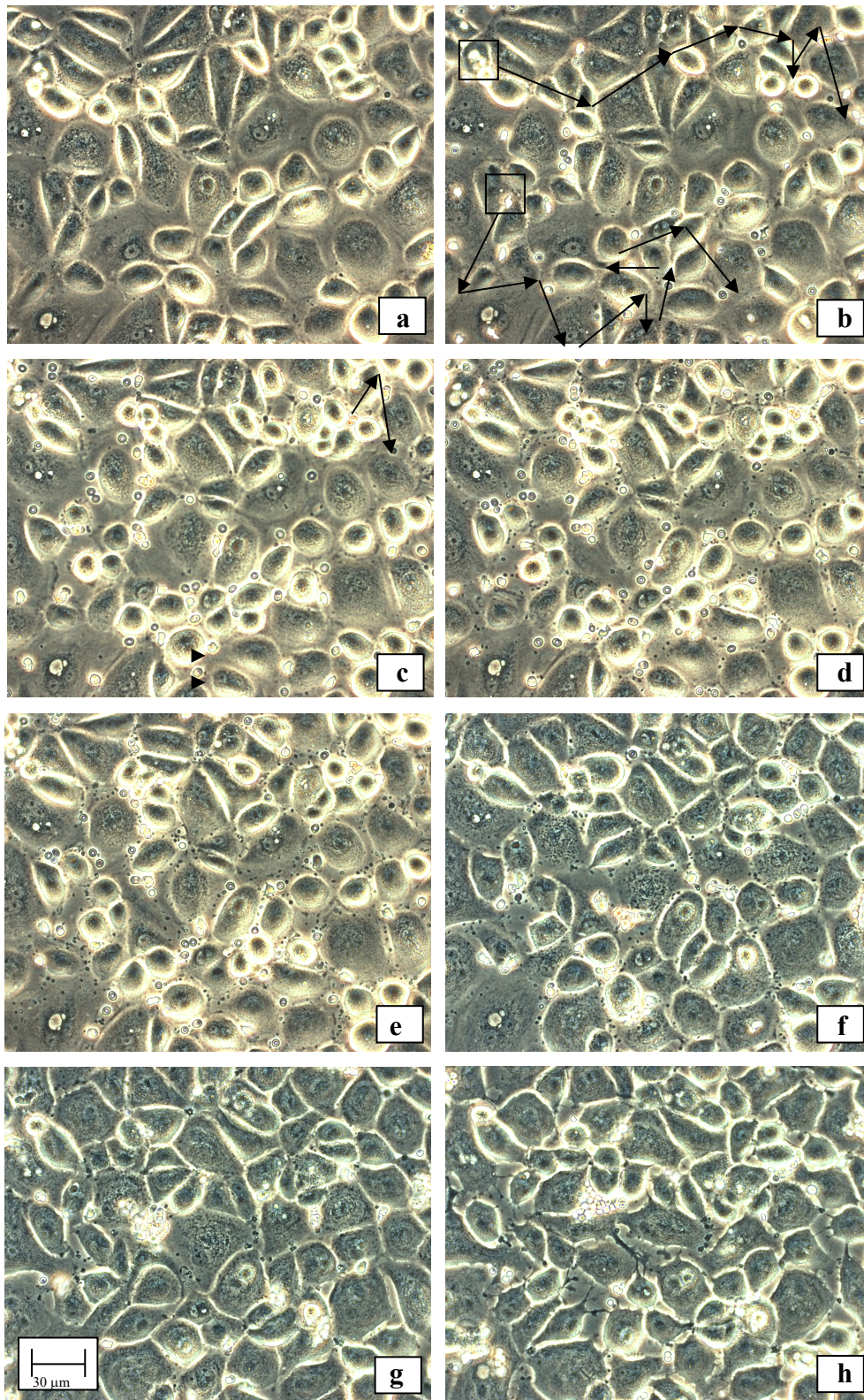
### **3.4.3 Schädigung von venulärem Endothel durch stimulierte PMN und Thrombozyten mit weitgehender Reversibilität nach Zugabe von Flavonoiden**

Durch die Etablierung von gereinigten Kulturen venulärer Endothelzellen aus den kardialen Venulen des Menschen bestand nun die Möglichkeit zur videomikroskopischen Beobachtung der Interaktion von Thrombozyten und PMN mit dem Endothel zum besseren Verständnis inflammatorischer Reaktionen. Die venulären Endothelzellen sind in der Lage, aktiv eine rasche Permeabilitätsänderung der Gefäßwand durch Öffnung ihrer Interzellularspalten herbeizuführen und eine Diapedese von PMN ins Gewebe zu ermöglichen. Die PMN können diese Permeabilitätsänderung selbst herbeiführen, allerdings zeigte sich in den durchgeführten Experimenten schnell, dass sie allein dazu nicht in der Lage sind. In nicht-aktiviertem Zustand besitzen die PMN keinen Einfluss auf das venuläre Endothel, auch eine feste Anheftung an die Endothelzelle und ein Durchtritt durch die Interzellularspalten sind nur in aktiviertem Zustand möglich. Zur Aktivierung der PMN wurde FMLP und ADP verwendet. Überraschend war jedoch, dass auch durch FMLP/ADP und dadurch aktivierte PMN alleine keine höhergradige Permeabilitätsänderung der Endothelschicht hervorgerufen werden konnte. Ein anderes Bild bietet sich nach zusätzlicher Zugabe von aktivierten Thrombozyten (siehe auch **Abb. 15, 16 und 17**). Hier stellt sich eine rasche und massive Permeabilitätserhöhung durch Kontraktion der venulären Endothelzellen ein, nun ist auch eine Diapedese der im aktivierten Zustand über die Endothelzellen wandernden PMN ein. Durch aktivierte Thrombozyten alleine ist dieser Effekt ebenfalls nicht zu erzielen.

Bei anhaltender Inkubation mit aktivierten PMN und Thrombozyten werden die venulären Endothelzellen durch die Ausschüttung von Granula seitens der PMN immer weiter geschädigt, bei längerer Exposition sterben die Endothelzellen sogar ab. Dies war in den durchgeführten Experimenten aber durch protektive Substanzen zu verhindern. Als besonders potent erwies sich hier die Substanzgruppe der Flavonoide. Im Experiment war durch die Zugabe von Quercetin selbst im Beisein von aktivierten PMN und Thrombozyten eine völlige

Erholung der Endothelschicht mit wieder komplettem Schluss der Interzellularspalten möglich.

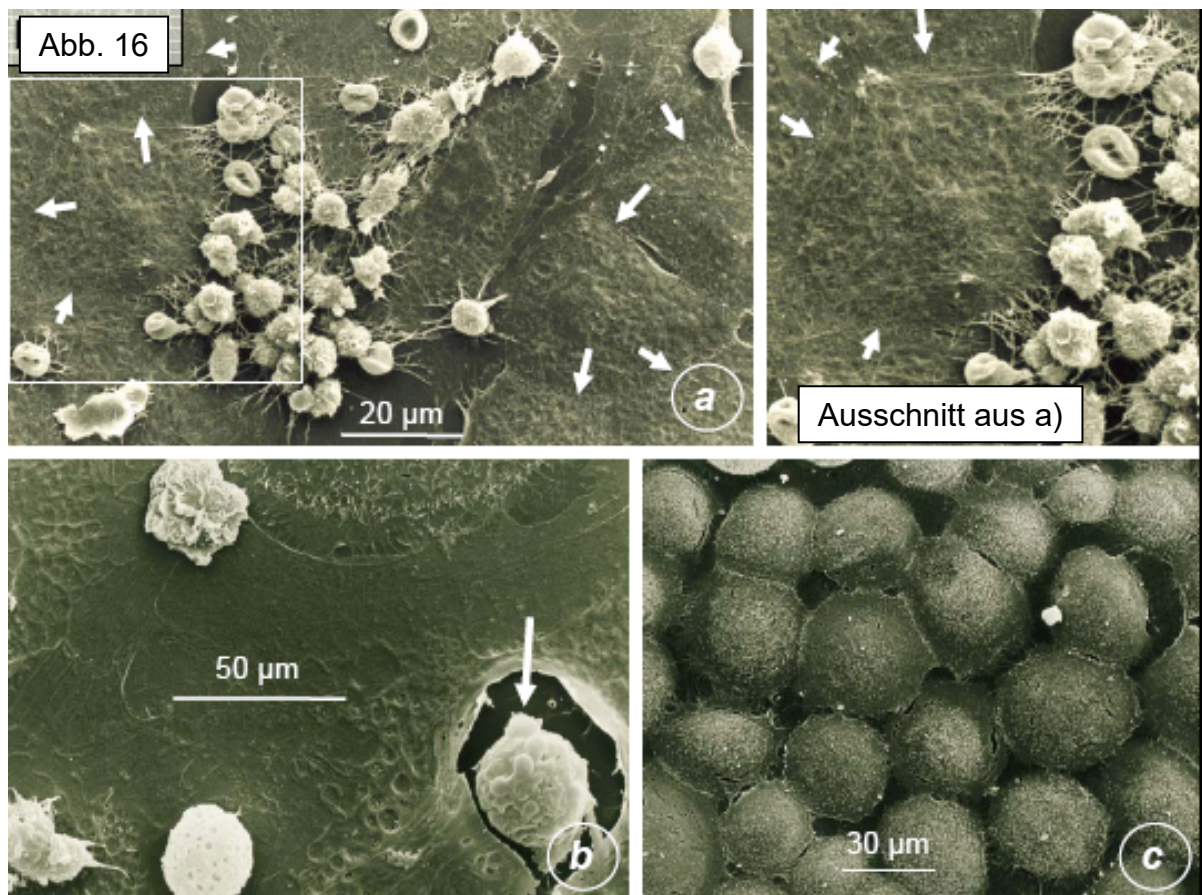




**Abb. 15a-h:**

Venuläre Endothelzellen aus dem menschlichen Herzen **a)** in Ruhe **b)** nach Zugabe von neutrophilen Granulozyten (PMN) **c)** nach Aktivierung der PMN mit FMLP **d)** nach Zugabe von Thrombozyten **e)** die Interzellularspalten der Endothelzellen öffnen sich **f)** nach Zugabe von Quercetin **g)** die Interzellularspalten schließen sich wieder **h)** nach 4h stellt sich langsam ein deutlicher Lichtschaden ein. Der Weg zweier PMN wird mittels Pfeilen in Bild **b)** dargestellt.





**Abb. 16:**

Venuläre Endothelzellen aus dem Rattenherzen im Rasterelektronenmikroskop **a)** Inkubation mit durch FMLP aktivierte PMN in Gegenwart von  $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ; die meisten Interzellularspalten (Pfeile) sind noch geschlossen **b)** Inkubation mit durch FMLP aktivierte PMN in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; ein Leukozyt wandert gerade durch die Endothelzellbarriere (Pfeil) **c)** VEB nach Vorinkubation mit zusammen aktivierten PMN und Thrombozyten; die Endothelzellen sind kontrahiert, die Interzellularspalten sind durchgehend geöffnet

## 4. Diskussion

Mit den Fortschritten in Biologie, Physiologie und Medizin ist in den letzten Jahrzehnten das Interesse am Studium der zellulären und subzellulären Vorgänge an lebenden Zellsystemen deutlich gestiegen. Damit verbunden ist die Notwendigkeit zur Etablierung funktionierender Systeme zur Beobachtung und Dokumentation dieser Vorgänge.

Als Ziel der vorliegenden Arbeit dient nun die Vorstellung, alle Vorteile dieser durchaus sehr verschiedenen Methoden und Ansätze zur Beobachtungen einer Gruppe von verschiedenen Zelltypen zu nutzen. Schnell wurden schon zu Beginn der Arbeit einige Probleme klar. Technische Ausrüstung für die verschiedenen Filmverfahren gab es, die analoge Videotechnik ausgenommen, kaum. Wenn vorhanden, war sie nicht ausgereift oder litt an Kapazitäts- oder Bandbreitenproblemen, ein Flaschenhals, der sowohl die zeitliche Auflösung wie auch die Bildqualität der Filme einschränkt<sup>57,82</sup>. Ebenso schwierig gestaltete sich die Suche nach geeigneter Software zur Akquirierung, Verwaltung und Bearbeitung der erhaltenen Datenmengen. Andere von mir befragte Gruppen die schon mit dem Axiovision/Axiocam-System von Zeiss arbeiten, konnten diese Schwierigkeiten aber bisher noch nicht befriedigend lösen. Nach umfangreichem Literaturstudium wurde klar, dass es nur sehr wenige Erfahrungen mit Software- und Hardwarelösungen im wissenschaftlichen Filmbereich gibt, die zusätzlich wegen des rasanten technischen Fortschritts eine extrem kurze Halbwertszeit besitzen und somit kaum nutzbar sind<sup>47,50,73,12</sup>. Ein anderes Kapitel sind die biologischen Probleme, viele Zellarten reagieren extrem sensibel schon auf geringe Störungen ihrer Umweltbedingungen, unter welche auch weniger nahe liegende Faktoren wie beispielsweise das Licht selbst fallen. Zeitrafferfilme über längere Zeiträume sind deswegen nur mit aufwendiger Vorbereitung, Pflege und Handhabung der Zellkulturen möglich<sup>85,67,74</sup>.

Der Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Nees am Physiologischen Institut der LMU liegt auf den verschiedenen Endothelzellarten und ihrer Interaktion mit Blutzellen und subendothelialen Zellen, deren Interaktionen zu filmen erschien besonders interessant. Es bot sich die Gelegenheit, eine Vielzahl dieser verschiedenen Zellarten nach schon vorhandenen Protokollen zu isolieren oder Kulturen für Versuchszwecke zu erhalten. Zusätzlich sollte in Analogie zu bestehenden Isolationsschemata zur Isolierung reiner venulärer Endothelzellen aus dem Herzen der Ratte entwickelt werden. Das Versuchssystem



Ratte bietet nicht nur den Vorteil der einfachen Verfügbarkeit und der allgemeinen Verbreitung als Versuchstier in vielen Arbeitsgruppen, sondern die Gefäßsysteme und insbesondere die Endothelzellen der Ratte gleichen auch denen des Menschen mehr als die anderer untersuchter Tierspezies wie Maus oder Meerschwein.

## **4.1 Vorteile und Limitationen der konventionelle Mikrophotographie, der analoger Videokinematographie und der computergestützten Aufnahmeverfahren**

### **4.1.1 Konventionelle Photographie**

Die konventionelle Photographie ist ein seit fast 150 Jahren angewendetes Verfahren, mittels durch Licht katalysierter chemischer Reaktionen auf entsprechend vorbehandelten Filmen Einzelbilder abzubilden. Da sich diese Technik über viele Jahrzehnte völlig konkurrenzlos verbreiten konnte, besteht überall vergleichsweise leichter Zugang zu entsprechenden Kameras und der Infrastruktur der Bildentwicklung. Die für Laiengeräte und -bildabzüge bestehenden niedrigen Preise dieser Technik relativieren sich im Profibereich jedoch schnell.

Bis vor kurzem konnte für die konventionelle Photographie die gegenüber den digitalen Aufnahmeverfahren überlegene Auflösung ins Feld geführt werden. Unter Auflösung wird die Anzahl verschiedener Bildpunkte auf einer Fläche des Abbildungsmediums angegeben, gängig ist die Angabe der Bildpunkte pro Quadratzoll. Seit sich jedoch im Profi- wie auch im Massensegment Digitalkameras mit einer Auflösung von über 4 Millionen Bildpunkten pro Zoll durchgesetzt haben, ist diese Technik in der maximalen Auflösung der konventionellen Photographie zumindest ebenbürtig und mit Sicherheit bald überlegen. Dies wird wohl trotz der Verbreitung der Hardware in den nächsten Jahren zu einem weitestgehenden Aussterben der konventionellen Photographie im wissenschaftlichen Bereich führen.

### **4.1.2 Analoge Aufnahmeverfahren**

Um analoge Videofilme von mikroskopischen Geschehen zu erhalten, ist es nötig, den C-Mount des Mikroskopes mittels Adapter mit einer CCD-Kamera zu bestücken. Eine CCD-Kamera enthält auf ihrer lichtempfindlichen Einheit ein Feld aus semikonduktiven Elementen,

welche in Proportion zu ihrer Lichtexposition eine Ladung aufbauen und somit ein Bild erzeugen. Dieses Bild wird durch sequenzielle Konvertierung der Ladung jedes Elements in eine Spannung in ein Videobild übersetzt. Der Transfer der Ladung entlädt die Elemente und macht sie bereit für das nächste Bild, die Expositionszeit ist somit identisch mit der Zeit zwischen den Entladungsvorgängen (normalerweise beträgt dieser Zeitraum  $1/30s$ , entsprechend dem amerikanischen Videostandard NTSC, der 30 Bilder pro Sekunde verlangt). Konventionelle Videobilder werden aus zwei überlappenden Linien-Scans zusammengesetzt. Die tatsächliche Zahl der Linien in jedem Scan hängen vom verwendeten Videostandard ab. Beim amerikanischen NTSC-Standard, der mit 60 Hz operiert, hat jedes Bild 512 Linien, wovon jedoch nur 480 Linien Bildinformationen enthalten. Der europäische PAL-Standard erzeugt bei 50 Hz Bilder, welche 625 Linien, davon 512 Linien mit Bildinformation besitzen. Es ist nur mit aufwendigen Modifikationen möglich, dieses Korsett der Videostandards zu verlassen, beispielsweise um für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen eine höhere Bildfrequenz zu erzielen. Eine Erhöhung der Bildauflösung ist mit handelsüblicher Ausrüstung nicht möglich.

Es ist möglich, die einschränkenden Videostandards zu umgehen, indem man das Ausgangssignal der CCD-Kamera mittels einer Frame-Grabber-Karte für den PCI-Steckplatz des Rechners direkt auf den Computer lenkt, die analogen Bildinformationen können dort digital abgespeichert werden. Doch momentan kann aufgrund technischer Beschränkungen die Bildauflösung  $512 \times 512$  Pixel bei 8 Bit Farbauflösung (entspricht Schwarzweißdarstellung bei 256 Graustufen) nicht überschreiten, da weiterhin 30 Bilder pro Sekunde anfallen. Ebenfalls möglich ist die Aufnahme von Realzeit- und Zeitraffervideofilmen auf digitalen Videorekordern. Diese beiden Verfahren haben den Vorteil, dass die analogen Bilder nun schon digital gespeichert werden und somit am Computer weiterbearbeitet und verwendet werden können. Trotzdem ist aufgrund der beschriebenen Limitierungen schon in absehbarer Zeit mit einem Verschwinden dieser Verfahren aus dem wissenschaftlichen Arbeitsbereich zu rechnen.

#### **4.1.3 Computergestützte Aufnahmeverfahren**

Seit einiger Zeit ist eine völlig neue Generation von digitalen Farbkameras auf dem Markt, welche nun auch für den Einsatz am Mikroskop interessant sind. Solche wissenschaftlichen Kameras, welche speziell für den Einsatz am C-Mount des Mikroskops optimiert wurden,

sind beispielsweise die Axiocam (Zeiss), die MDS 290 (Kodak) oder die Spot (Diagnostic Instruments). All diese Kameras können mit hoher Bildauflösung filmen, sind voll computergesteuert und haben eine gute Datenübertragungsrate. Somit ist es nun möglich, Bilder und Filmsequenzen ohne analoge Zwischenschritte digital und in hoher Bildqualität zu erhalten. Dadurch steht eine Vielzahl von neuen Anwendungsmöglichkeiten offen.

Als Ziel der vorliegenden Arbeit dient nun die Vorstellung, alle Vorteile dieser durchaus sehr verschiedenen Methoden und Ansätze zur Beobachtungen einer Gruppe von verschiedenen Zelltypen zu nutzen. Hier waren eine Vielzahl von Problemen zu lösen. Geeignete kommerziell erhältliche Systeme gab es nur für die analoge Videotechnik, jedoch waren diese nicht ausgereift, die Kapazität wie auch die Bandbreite waren nicht zufriedenstellend. Dies schränkte die zeitliche Auflösung wie auch die Bildqualität der Filme stark ein. Auch gab es noch keine fertigen Softwarelösungen zur Akquirierung, Verwaltung und Bearbeitung der erhaltenen teils großen Datenmengen. Auch in anderen die neuen computergesteuerten Mikroskopsysteme nutzenden Arbeitsgruppen waren diese Schwierigkeiten nicht befriedigend gelöst, dies bestätigte auch eine umfangreiche Literaturrecherche und auch Kontaktaufnahmen mit den Herstellern der Mikroskopsysteme. Es gab noch zu wenige Erfahrungen mit Software- und Hardwarelösungen im wissenschaftlichen Filmbereich, die verwendeten teils sehr provisorischen Lösungen waren zusätzlich wegen des rasanten technischen Fortschritts bereits wieder überholt. Insbesondere fehlte es noch an wirklich ausgereiften Komplettsystemen, somit musste jeweils aufwendig aus verschiedenen Hard- und Software-Komponenten eine individuelle Lösung etabliert werden. Diese Komplettsysteme müssen auch die biologischen Probleme der teils sehr sensiblen Zellkultursysteme berücksichtigen, die Veränderungen in ihrer Homöostase sehr schlecht tolerieren. Zeitrafferfilme über längere Zeiträume sind deswegen nur mit aufwendiger Vorbereitung und Pflege der Zellkulturen möglich.

#### **4.1.4 Praktische Handhabung digitaler Bild- und Videodaten**

Schon zu Beginn der vorliegenden Arbeit zeigte sich schnell, dass eine der Hauptschwierigkeiten in der Handhabung und Verwaltung und Verarbeitung des gewonnenen Film- und Bildmaterials liegen wird. Da im Rahmen der digitalen Photographie zur eindeutigen Festlegung der Eigenschaften jedes Bildpunktes bei der verwendeten Farbtiefe 3 Byte (entspricht 24 Bit, somit 24 Informationseinheiten nach dem 0/1-Prinzip der

elektronischen Datenverwaltung) notwendig sind, ergibt sich schon bei einer hauptsächlich verwendeten Auflösung von 1300/1030 Bildpunkten eine Bildgröße von fast 4 Megabyte. Da für einen für das menschliche Auge flüssig ablaufenden Film mindestens 25 Bilder pro Sekunde notwendig sind, wären dies um 100 Megabyte pro Sekunde, bei höherer Auflösung würde dies noch exponentiell zunehmen. Selbst moderne Personalcomputer sind aufgrund verschiedenster „Flaschenhälse“ (Lesegeschwindigkeit der Festplatte, internes Bussystem, Grafikspeicher) nicht in der Lage, solche Datenmengen flüssig darzustellen. Weiterhin muss bedacht werden, dass die teilweise aus mehreren tausend Einzelbildern angefertigten Zeitrafferfilme in der Rohfassung schnell zweistellige Gigabytegrößen aufweisen und somit auch zu Archivierungsproblemen führen.

Um Einzelbilder in Folge im Sinne eines Filmes hintereinander ablaufen zu lassen, werden in der elektronischen Datenverarbeitung so genannte Containerformate benutzt, das gängigste ist das AVI-Format. Ein Container enthält die unkomprimierte Information der eingeschlossenen Einzelbilder sowie eine Anweisung zur Reihenfolge der Bilder und zur Geschwindigkeit des Abspielens und entspricht in seiner Größe grob gesagt der Summe der Größe der Einzelbilder. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwies es sich aber als zweckmäßig, die angefertigten Filme durch Komprimierung in der Datenmenge auf etwa ein Zehntel der nativen Größe zu verkleinern. Eine höhere Komprimierung wäre ohne weiteres möglich, jedoch würde dann vom menschlichen Auge eine Vergrößerung der Darstellung wahrgenommen werden.

Das Prinzip der Komprimierung von Bewegtbildern beruht darin, nicht bei jedem neuen Einzelbild der Folge wiederum die gesamte Bildinformation zu speichern, sondern nur die Bildpunkte, die sich im Vergleich zum Vorbild verändert haben, selbst bei schnellen Bewegungen innerhalb des Filmes bei 25 Bildern pro Sekunde sind dies natürlich nur eine Minderheit. Außerdem werden homogene Gebiete in einer Summationsdarstellung erfasst (vereinfacht dargestellt: statt Rot-Rot-Rot wird 3x Rot gespeichert). Nach Versuchen mit mehreren Codecs (Software für Codierung/Decodierung von Filminformationen) wurde der Divx-Codec der Firma Divxnetworks als der am praktikabelste betreffend Komprimierungsleistung bei noch erhaltener guter Bildqualität ausgemacht. Ein weiterer Vorteil ist die inzwischen weite Verbreitung dieses Algorithmus, der über das Internet auch frei zugänglich und zu verbreiten ist.

Zur Nachverarbeitung digitaler Einzelbilder gibt es inzwischen eine ganze Reihe hervorragender Bildbearbeitungsprogramme, im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vor allem Photoshop 7 der Firma Adobe eingesetzt.

Zur Archivierung der umfangreichen Datenmengen sind momentan noch Bandlaufwerke am sinnvollsten, allerdings werden sich hier in Kürze wohl neue Generationen von optischen Brennlaufwerken durchsetzen, die dann eine vergleichbare Datenkapazität bei besserem Handhabungskomfort aufweisen werden.

## **4.2 Anwendungsgebiete der verschiedenen Bildgewinnungsverfahren**

Ein vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit stellt die Auswahl des jeweils besten Bildgebungsverfahrens für die im täglichen wissenschaftlichen Betrieb anfallenden Fragestellungen dar. Hierfür erfolgt eine Unterscheidung in die Dynamik des zu beobachtenden Systems.

### **4.2.1 Nichtdynamische Systeme**

Unter nichtdynamischen Systemen werden hier Objekte zusammengefasst, die auch über einen längeren Beobachtungszeitraum keine Veränderungsdynamik zeigen, ein Beispiel wäre hier eine fixierte Zellkultur. Somit ist die Anfertigung von Standbildern völlig ausreichend, es ist nicht notwendig, durch Bilderfolgen einen Verlauf zu dokumentieren. Somit ist hier die Auflösung der erstellten Bilder das einzige relevante Kriterium.

Unter Auflösung versteht man das Maß für die vertikale und horizontale Dicht eines Bildes. Das Maß wird in Bildpunkten (Pixel) angegeben. Je höher die Auflösung für ein Bild, desto besser der optische Eindruck. Den Begriff des Auflösungsvermögens kennt man auch aus der herkömmlichen Fotografie. Hier gibt es Filme mit unterschiedlichen Auflösungen. Man spricht von hochempfindlichen Filmen (grobkörnigen) und niedrig empfindlichen Filmen. Die grobkörnigen Filme haben ein geringeres Auflösungsvermögen als Filme mit einer niedrigen Körnung. Die Auflösung von normalen konventionellen Filmen liegt bei ca. 10 Mio. Bildpunkten, bei professionellen Filmen sogar noch höher. Die Auflösung der erhältlichen wissenschaftlichen digitalen Kameras liegen zurzeit noch in einer ähnlichen Größenordnung,

bei der im professionellen Bereich momentan häufigen Auflösung von 4096 x 3070 wären dies 12,5 Mio. Bildpunkte. Somit ist auch bezogen auf die Auflösung beim momentanen Stand der Technik die konventionelle analoge Photographie zwar eine noch praktikable, aber nicht mehr überlegene Methode.

#### **4.2.2 Dynamische Systeme**

Als dynamische Systeme werden in der vorliegenden Arbeit Objekte bezeichnet, die während des Beobachtungsintervalls Veränderungen zeigen, allerdings nicht in einer Geschwindigkeit die eine rasche Bildfolge notwendig machen würde. So zeigen etwa die untersuchten Zellkultursysteme sichtbare Reaktionen auf äußere Reize eher in Zeiträumen von Minuten oder sogar Stunden. Entscheidend ist hier also nicht eine rasche Aufnahme von Einzelbildern um eine hohe Dynamik abzulichten, sondern vielmehr Bilderfolgen mit hoher Auflösung zu erzielen. Auch ist es zur Visualisierung der zellulären Reaktionen notwendig, die Einzelbildfolgen in Zeitrafferfilmen sichtbar zu machen, was eine einfache Weiterverarbeitung der Rohdaten beispielsweise in Filme erlaubt.

Als ideal erwiesen sich hier die computergestützten Aufnahmeverfahren, welche es mittels einer hochauflösenden Digitalkamera und eines voll computersteuerbaren Mikroskops erlauben alle oben aufgeführten Kriterien zu erfüllen. Mit dem im Punkt 3.2 beschriebenen Aufnahmesystem gelingt eine eindrucksvolle Darstellung zellulärer Reaktionen in diversen Zellkultursystemen, in der vorliegenden Arbeit insbesondere im Bereich venulärer Endothelien. Diese können mittels Zeitrafferfilmen auch für Vorträge und Präsentationen leicht aufgearbeitet werden. Wegen der momentan noch limitierten Datenübertragungsraten im Bussystem von bezahlbaren Computersystemen ist allerdings eine schnelle Bildfolge mit weiterhin hoher Auflösung zur Darstellung von hochdynamischen Reaktionen noch nicht möglich.

#### **4.2.3 Hochdynamische Systeme**

Unter hochdynamischen Systemen schließlich sind Objekte zu verstehen, die schon in Echtzeit sichtbare Veränderungen zeigen, die zu dokumentierenden Vorgänge laufen somit in Sekunden bis Minuten ab und erfordern eine rasche Folge von Einzelbildern. In der vorliegenden Arbeit wurden als Referenz isolierte Kardiomyozyten verwendet und deren

Kontraktionsbewegungen dokumentiert. Die Bildauflösung kann hier nicht als das herausragende Kriterium angesehen werden. Somit muss hier momentan die analoge Videotechnik eingesetzt werden, die nach den gängigen Videostandards Bildfolgen von 25-30 Bilder pro Sekunde erlaubt (siehe hierzu Abschnitt 4.1.2), wenn auch in nur ausreichender Bildauflösung.

Klar ist, dass sich in naher Zukunft auch zur Dokumentation hochdynamischer Systeme computergestützte Aufnahmeverfahren als Referenz etablieren werden. Die beschriebenen Flaschenhälse werden sich mit den Fortschritten der Hardware-Entwicklung beseitigen lassen. So werden zukünftige PC-Bussysteme (z.B. HyperTransport, InfiniBand oder EtherCAT) auch eine Echtzeitakquise von sehr hochauflösenden Bildern in ausreichender Framerate zulassen.

### **4.3 Die Bedeutung von Umgebungsfaktoren für die mikroskopische Beobachtung lebender Zellsysteme über längere Zeiträume**

Bei der Beobachtung lebender Zellsysteme unter dem Mikroskop sollten viele Faktoren berücksichtigt werden, Hierzu zählen Temperatur, Luftfeuchtigkeit, pH, Osmolarität und die applizierte Photonendosis. Nur durch sorgfältige Kontrolle und Einstellung dieser Faktoren kann sichergestellt werden, dass beobachtete Veränderungen relevant sind und nicht auf einer Störung durch falsche Umgebungsbedingungen hervorgerufen werden.

Die Bedeutsamkeit phototoxischer Effekte durch die Lichtquelle von Mikroskopen in lebenden Zellsystemen ist wohldokumentiert<sup>69,19</sup>. Eine „sichere“ Photonendosis gibt es nicht, Schäden können prinzipiell schon bei geringster Lichtstärke auftreten. Somit sollte bereits vor einem Versuch das Versuchsdesign bezogen auf die applizierte Photonendosis überprüft werden: Wieviel Lichtstärke ist notwendig (auch abhängig davon wofür das Bild benötigt wird)? Kann ein Shutter eingesetzt werden und auf welche Öffnungszeit muss dieser programmiert werden? Wie viele Bilder sind insgesamt notwendig? Welche Wellenlänge des Lichts wird eingesetzt?. Wie unter 3.2.4 nachzulesen waren diese Fragen für die durchgeführten Untersuchungen von hoher Bedeutung. In der Literatur sind auch andere Ansätze zur Vermeidung phototoxischer Effekte beschrieben. So reduziert ein mit 300 Hz gepulstes LED-Licht als Lichtquelle die phototoxischen Effekte wohl erheblich, auch kann dadurch die Erwärmung der Zellkultur reduziert werden<sup>15</sup>.



Es sollte selbstverständlich sein, dass Zellkulturen auch während mikroskopischer Beobachtung eine ideale Umgebungstemperatur benötigen. Aber ist es denn wirklich so schlimm, wenn die Temperaturen am Schalenboden kurzzeitig auf Raumtemperatur abfallen? Dies kann eindeutig bestätigt werden. Neben den Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit (siehe Punkt 3.2.3) sind Stresseffekte durch einen solchen Temperaturabfall vom Mitose-Stopp und -Umkehr bis hin zum Zelltod schon bei Temperaturen unter 35° Celsius dokumentiert<sup>90</sup>. Grundsätzlich gibt es zwei sinnvolle Ansätze um die Umgebungstemperatur im optimalen Bereich einzustellen. Es kann eine Inkubationskammer auf dem Objektisch gebaut werden oder es kann das ganze Mikroskop in eine geheizte Kammer gesetzt werden. Der Vorteil einer Inkubationskammer auf dem Objektisch ist die bessere Zugänglichkeit an das Mikroskop, während in einer Kammer um das Mikroskop herum die Temperaturschwankungen geringer sind. Während noch vor wenigen Jahren selbstgebaute Lösungen überwogen sind nun seit kurzem auch kommerzielle Systeme (u.a. CellAsci, Axiocam Cell Observer, Physitemp) eingeführt oder stehen kurz vor der Einführung

Ein weiterer wichtiger Aspekt betrifft das Kulturmedium. Hier ist insbesondere auf die Aufrechterhaltung eines stabilen pH-Wertes zu achten. Grundsätzlich gibt es neben CO<sub>2</sub>-unabhängigen Medien (zumeist durch HEPES gepuffert) auch sogenannte CO<sub>2</sub>-abhängige Medien. Da nicht alle Zellarten HEPES gepufferte Medien gut tolerieren muss bei CO<sub>2</sub>-abhängigen Medien für eine konstante CO<sub>2</sub>-Konzentration (üblicherweise 5%) durch Zuleitung gesorgt werden. Bezüglich der dafür notwendigen Inkubationskammer darf auf den letzten Abschnitt verwiesen werden. Auch muss gerade bei längerer Beobachtungszeit die durch die Verdunstung aufgetretene Osmolaritätsänderung im Kulturmedium durch Zugabe von hypoosmolarer Elektrolytlösung ausgeglichen werden.

#### **4.4 Isolierung und Identifizierung venulärer Endothelzellen aus dem Ratten- und Menschenherzen sowie Erkenntnisse über zelluläre Wechselwirkungen venulärer, arteriolärer und kapillärer kardialer Endothelzellen durch videomikroskopische Zeitrafferbeobachtung**

Als innerste Zellschicht des gesamten Kreislaufsystems stellt das einschichtige Endothel den eigentlichen Blutbehälter dar<sup>4</sup>. Immer mehr wird deutlich, dass das Endothel in seinen verschiedenen vaskulären Provinzen gemeinsame, aber auch stark spezialisierte Funktionen ausübt<sup>1,42</sup>. Allen Endothelien gemeinsam ist eine aktiv betriebene Antithrombogenität, die durch antiaggregative (Plättchen-hemmende), antikoagulatorische (gerinnungshemmende) und profibrinolytische (Fibrinogen-fördernde) Funktion zustande kommt<sup>54,71,23</sup>.

Hochspezialisierte endotheliale Wirkungen entfalten sich organspezifisch, aber auch im Hinblick auf die verschiedenen Segmente der mikrovaskulären Gefäßsysteme<sup>89,68</sup>. Da jeglicher Stoffaustausch zwischen Blutmilieu und parenchymastösen Organen über das Endothel verlaufen muss, ist dieses insbesondere in Bereich der mikrovaskulären Abschnitte (hier liegt eine besonders hohes Verhältnis von Endotheloberfläche zu Blutvolumen vor) zum Transport von molekularen Stoffen aber auch zum Durchtritt von Zellen wie den Leukozyten imstande. Das mikrovaskuläre Stromgebiet wird in Arteriolen, Kapillaren und Venulen eingeteilt, die kleinsten Einheiten bestehen aus einer zuführenden Arteriole mit anschließendem Kapillarnetz und einer oder mehreren abführenden Venulen<sup>68</sup>. In den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit klinischer Forschung ist in den letzten Jahren das Endothel auch gerade im Zusammenhang mit onkologischen Vorgängen wie der Angiogeneese solider Tumoren gerückt. Immer noch nicht ausreichend aufgeklärt ist auch die Rolle des Endothels im Zusammenhang mit der Entstehung arteriosklerotischer Plaques an der Gefäßwand

Am besten untersucht sind bisher die Arteriolen – in denen das Endothel vielschichtige Funktionen der Blutfluss- und Blutdruckregulation wahrnimmt<sup>89</sup> – und verschiedene Kapillartypen, in denen das Endothel mannigfaltige Transportfunktionen insbesondere von Gasen und niedermolekularen Substanzen ausübt<sup>1</sup>. Überraschend wenig Aufmerksamkeit hat bisher allerdings das venuläre Endothel gefunden, wenn auch die Untersuchungen verschiedener Mikrozirkulationsforscher in letzter Zeit immer mehr darauf hinweisen, dass in den kleinsten Venen des Körpers unter anderem die Rekrutierung der Masse aller zellularen und humoralen Faktoren der Immunabwehr für die umliegenden Gewebe gesteuert wird<sup>53,58</sup> und diese Gefäße daher eine zentrale Rolle bei allen Entzündungs- und Reperusionsprozessen spielen.

In der Mikrozirkulation folgt auf eine zuführende Arteriole und das ihr anschließende Kapillarnetz immer eine oder mehrere abfließende postkapilläre Venule (Durchmesser 10-40µm), die später in Sammelvenulen ((Durchmesser 40-100µm) übergehen<sup>68,83</sup>. Die venulären

Endothelzellen unterscheiden sich von den übrigen Zellen des Endothels schon morphologisch. Ihr Verbund ist vergleichsweise lose, gehalten durch eine löchrige Basalmembran und mit je nach Situation unterschiedlich ausgeprägten teilweise stark durchlässigen Interzellularspalten, worüber die Extravasation von Makromolekülen und polymorphonukleären Granulozyten (PMN) reguliert werden. Ebenfalls dem Stofftransport zwischen Blutmilieu und umliegendem Gewebe dienen Zellorganellen, die bisher nur bei venulärem Endothel beschrieben wurden, die sogenannten vesikulo-vakuolären Organellen (VVO)<sup>22</sup>. Bei diesen sich in Clustern zu mehreren Hundert Einheiten zusammenlagernden vesikulären Zellstrukturen konnte experimentell der Transport von Makromolekülen durch die Zelle hindurch nachgewiesen werden<sup>28,52</sup>.

Ebenso der Funktion als Pförtner zwischen Blutmilieu und Gewebe dienlich ist die Fähigkeit der venulären Endothelzelle zur aktiven Kontraktion<sup>5,34</sup>, auch dies ein Alleinstellungsmerkmal im Vergleich zu anderen Endothelzellen. Ähnlich einer Muskelzelle besitzt auch die venuläre Endothelzelle insbesondere im Bereich von Zellverbindungen Myosin, Aktin und Tropomyosin<sup>36,8</sup>. Sie kann durch eine Calcium-vermittelte Zellkontraktion<sup>16</sup> die Interzellularspalten (junctions) weit öffnen und somit die Diapedese von PMN und den Durchtritt von Makromolekülen ermöglichen. Es gilt als gesichert, dass dieser Vorgang unter anderem durch Entzündungsmediatoren gesteuert wird<sup>39,6</sup>.

Schon seit längerer Zeit bekannt ist auch die Ausstattung der venulären Endothelzelle mit im Vergleich zum übrigen Endothel unterschiedlichen Oberflächenmarkern. In der Vergangenheit wurde hier insbesondere die Dipeptidylaminopeptidase IV (CD 26) als Oberflächenmarker des postapillären Endothels beschrieben, die sich wegen ihrer Eigenschaft als Ektopeptidase (durch Abspaltung eines Dipeptids von zugesetztem Gly-Pro-Methoxy- $\beta$ -Naphthylamid) auch gut für histologische Färbungen eignet<sup>51,37</sup>. Der arterielle Schenkel der Mikrozirkulation dagegen zeichnet sich im histologischen Präparat dagegen vor allem durch das Vorhandensein von alkalischer Phosphatase aus<sup>51</sup>, welche allerdings nicht von den arteriellen Endothelzellen, sondern von den darunterliegenden Perizyten (welche im venulären Schenkel des Gefäßsystems nicht vorkommen) exprimiert wird<sup>37,40,20,77</sup>.

Ebenfalls bekannt und recht gut untersucht sind Vorhandensein und die Funktion von Leukozytenadhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, PECAM1, P-Selektin und E-Selektin) auf venulären Endothelzellen<sup>26,17,84</sup>. Diese werden unter Einfluss von Entzündungsmediatoren

verstärkt gebildet<sup>32,48,86</sup> und ermöglichen die Diapedese von PMN ins umliegende Gewebe. Nachdem ein intraluminaler neutrophiler Granulozyt initial nur über P-Selektin<sup>65,78,71</sup> eine lose Bindung mit der venulären Endothelzelle aufnimmt (er „rollt“ über deren Oberfläche) kann durch vom Endothel freigesetztes IL-8<sup>29</sup> sowie durch Bindung an E-Selektin eine Aktivierung der PMN erfolgen, in deren Folge eine festere Bindung zu ICAM-1 entsteht<sup>60,59,79,49,13</sup>. Hierdurch vermittelt werden die PMN über PECAM-1 durch die Interzellularspalten ins Parenchym geschleust<sup>63,91,90</sup>. Dass die Aktivierung der PMN durch Thrombozyten unterstützt zum Teil über das Endothel vermittelt<sup>56,30,87</sup>) wird ist bekannt<sup>44,38</sup> und wird auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nochmals deutlich gemacht.

Um die inflammatorische Reaktion in einem Gewebe zu beeinflussen, wäre es deshalb wünschenswert, das venuläre Endothel als Vermittler der Entzündung antiphlogistisch zu beeinflussen. Dass hierzu die Substanzklasse der Flavonoide durch Hemmung von ICAM-1, VCAM1 und der Selektine<sup>46,31</sup> in der Lage ist wurde schon früher in wenigen Arbeiten gezeigt<sup>55,61,81,64</sup> und wird nun durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nochmals bestätigt.

#### **4.4.1 Isolierung und Identifizierung venulärer Endothelzellen**

Das Myokard setzt sich aus einem Netzwerk der verschiedensten Zellarten zusammen, welche durch einen engen Verbund elastischen Bindegewebes verankert ist. Jede Zelle ist mit ihren Nachbarn über enge Zell-zu-Zell-Verbindungen, sogenannte gap-junctions, verbunden und pflegt mit diesen einen regen Austausch von Stoffen und Informationen. Dieses Geflecht zu lösen ohne die einzelnen Zellen zu töten, eine einzelne Zellart daraus noch vital zu isolieren und anzuzüchten erscheint schon theoretisch keine leichte Aufgabe. Dies besonders, wenn die zu isolierende Zellart wie hier das venuläre Endothel in verschwindender Minderheit zu den anderen Zellarten steht. Um eine Kultur von venulären Endothelzellen in annähernd reiner Form zu erhalten, müssen diese um den Faktor 1:10.000 angereichert werden.

In der Vergangenheit wurde oft durch mechanische Verfahren versucht, reine Kulturen mikrovaskuläre Endothelzellen aus den verschiedensten Spezies und Organen zu erhalten. Die mangelnde Vitalität der hiermit erhaltenen Zellen kann mit dem brutalen Abreißen der Zell-zu-Zell-Verbindungen und dem damit verbundenen Ausstrom intrazellulärer Bestandteile in Verbindung gebracht werden. Andere Autoren legten frische Gewebestücke in Nährmedium aus und wollten nach Entnahme dieser Stücke hochreine Kulturen von Endothelzellen (welche rasch aus dem Gewebe auswandern und besser anheften sollen) erhalten haben. Dies steht in

diametralem Gegensatz zu den Erfahrungen im Rahmen dieser Arbeit, spätestens histologisch erweisen sich auf ähnlichen Wegen erhaltene Kulturen (auch wenn mikroskopisch im Nativpräparat teilweise die typische „Pflasterstein“-Morphologie zu bestehen scheint) immer als Mischkulturen. Wieder andere Autoren bevorzugten immunologische Methoden, beispielsweise nach Ankoppelung der Zellen an Magnetbeads. Hier wurden in der Vergangenheit in der Arbeitsgruppe von Prof. Nees viele Versuche zur Reproduktion der Ergebnisse durchgeführt, eine zufrieden stellende Reinheit der hiermit erhaltenen Kulturen gelang nie.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Prinzip der Abtrennung der einzelnen Zellarten dagegen beruht erstens auf einer vergleichsweise sanften proteolytischen Dissoziation des Myokards, da hier nur geringe Scherkräfte auf die Zellverbände wirken, können fast ausschließlich lebensfähige und in Kultur vermehrungsfähige Zellen aus dem Bereich der Mikrovaskulation gewonnen werden. Das zweite Prinzip besteht darin, die durch proteolytische Dissoziation gewonnenen Einzelzellen und kleinen Zellkonglomerate unter Ausnutzung ihrer mechanischen und physikalischen Eigenschaften wie Größe, Form und spezifischem Gewicht in einer Dichtegradientenzentrifugation zu separieren. Da es mit dem beschriebenen Verfahren möglich war, annähernd kontinuierliche Dichtegradienten aus Percoll (imprägnierte, osmotisch zu vernachlässigende Siliziumoxidpartikel) herzustellen, konnten auch die in früheren Versuchen üblichen zellschädigenden Effekte bei diskontinuierlichen Gradienten und dem damit verbundenen Scherkräften beim Übergang zwischen den Schichten vermieden werden. Insbesondere bei den Versuchen zur Isolation von venulären Endothelzellen aus dem Myokard der Ratte konnten auf diese Weise fast vollständig reine Kulturen gewonnen werden. Eine weitere Reinigung mittels eingestellten Protaminchloridlösungen wie bei anderen Spezies war hier oft nicht mehr notwendig. Dieses einmal etablierte vergleichsweise einfache Protokoll ermöglichte in der Folge die schnelle und quantitativ auch hohe Produktion von sehr reinen Endothelkulturen, welche für die durchgeführten videomikrographischen Studien auch benötigt wurden.

War es schließlich gelungen, Endothelzellkulturen zu isolieren und zu kultivieren, bildeten sie einen einschichtigen und unter physiologischen Bedingungen makroskopisch dichten Zellrasen mit der typischen Pflastersteinmorphologie. Schon in der Vergangenheit war der Nachweis erfolgt, dass sich Endothelzellen durch eine hohe Konzentration vom FVIII:Ag (auch bekannt als von-Willebrand-Protein) auszeichnen. Daneben kann eine Markierung mit

fluoreszierendem ACLDL erfolgen. Ein (neben aktivierten Lymphozyten) für venuläres Endothel spezifischer Marker ist aber Dipeptidylaminopeptidase IV (DAP IV, CD26)<sup>48,49</sup>, dies konnte auch in der Vergangenheit durch die Arbeit der Gruppe um Prof. Nees nochmals bewiesen werden<sup>88</sup>. Um sicherzustellen, dass es sich bei den vorliegenden Zellkulturen wirklich um hochreine venuläre Endothelzellen handelt, wurde die Funktion der DAP IV als Ektopeptidase (durch Abspaltung eines Dipeptids von zugesetztem Gly-Pro-Methoxy- $\beta$ -Naphthylamid) für histologische Färbungen sowohl von Schnittpräparaten als auch von Kulturen genutzt (siehe hierzu auch nochmals Abbildungen 1 und 2). Zusätzlich wurde als Gegenfärbung auch zum Ausschluss von Verunreinigungen auf die perizytenpezifische alkalische Phosphatase gefärbt.

#### **4.4.2 Verminderte Endotheldichte infolge der Entzündungssituationen**

Die mikrovaskuläre Dysfunktion unter entzündlichen Bedingungen (durch Entzündungsmediatoren, Endotoxine, Reperfusion) ist mit einer Vielzahl von Interaktionen zwischen dem Endothel insbesondere des venulären Schenkels der mikrovaskulären Stromgebiete auf der einen Seite und der Leukozyten und Thrombozyten auf der anderen Seite verbunden. Wie schon in der Einleitung ausgeführt kann in der durch die oben genannten Faktoren ausgelösten Entzündungsreaktion eine Kaskade in Gang gesetzt werden, in deren Verlauf durch eine wechselseitige Beeinflussung dieser Zellen schließlich eine Aktivierung und Extravasation der PMN erfolgt. Um diese Extravasation möglich zu machen, muss die Endothelzelle zu einer Öffnung der Intrazellulärspalten veranlasst werden. Es hat sich nun gezeigt, dass dieser Effekt zumindest zu einem Teil auch durch eine Schädigung des Endothels mutmaßlich durch Entleerung von Granula durch den aktivierten Leukozyten erreicht wird. Dies kann auch in den durchgeführten Untersuchungen sehr gut nachvollzogen werden. Für diese Sichtweise spricht auch die Tatsache, dass auch andere „Stressoren“ einen ähnlichen Effekt mit Öffnung der Interzellularspalten und im Extrem mit letaler Zellschädigung auf einen Endothelrasen haben. Neben schon auf den ersten Blick nachvollziehbaren Faktoren wie einer nicht physiologischen Umgebungstemperatur und nicht optimalen Kulturmedien fanden sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch überraschende Dinge wie längere Applikation von grellem Licht. Dies passt auch gut zu neueren Erkenntnissen, nach denen im Cremaster-Muskel von Mäusen durch Licht Venulitis und Thrombosen im Experiment ausgelöst werden konnten<sup>72</sup>.

#### **4.4.3 Antiphlogistische Substanzen beeinflussen die entzündliche Reaktion an der Endothelbarriere**

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, kann eine fortdauernde Entzündungssituation innerhalb des postkapillären venösen Abschnitts des kardialen Mikrogefäßsystems zu einer schweren Schädigung des Endothels, im Extremfall bis zur irreparablen Schädigung, führen. Die Barrierefunktion zum umliegenden Gewebe wäre damit aufgehoben. Nach Zugabe von antioxidativ wirksamen Reagenzien war dieser Prozess im Experiment im Idealfall wieder vollständig reversibel. Als besonders wirksam erwiesen sich hier die Flavonoide, verwendet wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit Quercetin. Es konnte gezeigt werden, dass die protektive Wirkung der Flavonoide über eine Erhöhung der NO-Synthese und eine Verminderung von Hyperoxiden abläuft<sup>3,33</sup>. Nicht beeinflusst wurde durch Quercetin die Rekrutierung von durch FMLP-aktivierten PMN in das umliegende Gewebe. Es kann somit geschlossen werden, dass die postkapillären Venulen im Mikrogefäßsystem des Herzens eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Entzündungsprozessen durch ihre Interaktion mit PMN und Thrombozyten spielen. Auch bleibt die vielversprechende Aussicht auf einen neuen Ansatz bezüglich organprotektiver Behandlungen durch die Substanzklasse der Flavonoide festzuhalten. Metaanalysen konnten zuletzt eine Verminderung des kardiovaskulären Risikos durch diätetisch aufgenommene Flavonoide zeigen<sup>41</sup>. Auch bei anderen Substanzklassen wie z.B. NSAR konnte eine antioxidative und damit endothelprotektive Wirkung nachgewiesen werden<sup>62</sup>.

#### **4.5 Ausblick**

Erstmals wird im Rahmen dieser Dissertationsarbeit die Etablierung hochreiner venulärer Endothelzellen aus dem Mikrogefäßsystem des Rattenherzens beschrieben. Aber auch aus anderen definierten Gefäßprovinzen der Ratte und des Menschen werden Endothelzellen isoliert und angezüchtet. Dies erlaubt zukünftig viele neue physiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion der Endothelbarriere und zum Ablauf beispielsweise von Entzündungsreaktionen oder angiogenetischen Prozessen. Die spezifischen Interaktionen insbesondere der venösen Endothelzellen mit den Abwehrzellen des Blutes (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) und den Blutplättchen können nun gezielt untersucht werden. Hier ist natürlich insbesondere auch die Emigration aus dem Blut in die umliegenden Gewebe zu

nennen. Dieses Verhalten ist durch den Einsatz von Entzündungsfaktoren gezielt zu beeinflussen.

Die Relevanz dieser Untersuchungen ist offenkundig. Akute Entzündungsreaktionen aber auch chronische Prozesse wie die chronisch venöse Insuffizienz im Bereich der Beinvenen können durch Antioxidantien und möglicherweise auch durch andere die Endothelzellen stabilisierende Substanzen beeinflusst werden. Auch Reperfusionsschäden könnten so vermindert werden. Dies kann über die etablierten Zellkultursysteme untersucht und mittels der nun etablierten visuellen Dokumentationsmöglichkeiten auch dokumentiert werden, eine erhebliche Vereinfachung und Veranschaulichung.

## **5. Zusammenfassung**

In einem einleitenden Kapitel wurde ein kurzer Überblick über den Stand der technischen Entwicklung bezüglich moderner mikroskopischer Darstellungs- und Bildgebungsverfahren gegeben. Die Probleme insbesondere bei der Dokumentation dynamischer Vorgänge in diesem Bereich wurden aufgezeigt.

Danach erfolgte ein kurzer Überblick über die histologischen wie funktionellen Aspekte des kardialen Mikrogefäßsystems, insbesondere über die morphologischen und funktionellen Besonderheiten sowie die physiologischen Aufgaben des venulären Schenkels und des venulären Endothels. Die entzündliche Reaktion am venulären Endothel wird unter besonderer Berücksichtigung der Leukozytendiapedese beschrieben.

Ziel eigener Studien war die Entwicklung und Etablierung eines Bildgebungssystems insbesondere von dynamischen Vorgängen im mikroskopischen Bereich, beispielsweise in Zellkulturen. Als Studienobjekt sollten Zellen aus dem Bereich des Mikrogefäßsystems isoliert und kultiviert werden. Als Schwerpunkt wurde das venuläre Endothel aus Ratten- und Menschenherzen bestimmt, letzteres insbesondere durch die Möglichkeit der Beobachtung von inflammatorischen Reaktionen und Interaktionen mit Blutzellen.



Durch Anwendung eines speziell ausgearbeiteten Protokolls gelang es, Ratten- und Menschenherzen mit Hilfe eines optimierten Kollagenase-Dispase-Albumin-Gemisches im Kardiomyozyten und Zellen des Mikrogefäßsystems zu zerlegen. Letztere wurden über ein Siebsystem fraktioniert und weiter zerlegt. Durch einen Dichtegradienten wurden die einzelnen Zellarten mittels Zentrifugation separiert und getrennt ausgesät und kultiviert. Der Reinheitsgrad der verschiedenen Zellarten wurde durch Spezialmedien und eingestellte Protaminchloridlösungen noch weiter erhöht, dies wird durch histologische Färbungen nachgewiesen und dokumentiert.

Die nächste Aufgabe bestand in der Etablierung möglichst physiologischer Umweltbedingungen von Zellkultursystemen unter dem Mikroskop zur mikroskopischen Langzeitbeobachtung und Videodokumentation empfindlicher Zellsysteme.

Verschiedene Bild- und Videodokumentationssysteme (konventionelle Mikrophotographie, analoge Videokinematographie und digitale Videokinematographie) zur Beobachtung von Vorgängen auf mikroskopischer Ebene wurden unter Verwendung eines speziellen computergesteuerten Mikroskops entwickelt. Hierzu gehört auch die Weiterverarbeitung und Aufarbeitung des hierbei gewonnen Datenmaterials. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Aufnahmeverfahren werden gegenübergestellt. Davon ausgehend wird abhängig von der Dynamik eines beobachteten Systems die hierfür ideale Aufnahmetechnik herausgearbeitet.

Mit den nun zur Verfügung stehenden Bildgebungsverfahren sowie den Zellen aus dem mikrovaskulären Gefäßsystems werden Studien zur Barrierefunktion der Endothelschranke und der Interaktion mit den Zellen des Blutes betrieben. Es zeigt sich unter anderem, dass nur aktivierte Granulozyten und nur in Verbindung mit Blutplättchen im Bereich der venulären Strombahn eine Freigabe des Durchtrittsweges für PMN ins Gewebe durch die venulären Endothelzellen im Sinne einer entzündlichen Reaktion erreichen können. Durch Antioxidantien wie Flavine kann die Dichtigkeit der Endothelschranke wiederhergestellt werden. All dies kann durch die Anfertigung von Zeitrafferfilmsequenzen eindrucksvoll dargestellt werden.

Zuletzt wurden Möglichkeiten aufgezeigt, die sich für weitere Studien im Bereich des Mikrogefäßsystems durch die nun zur Verfügung stehenden Zellisolationstechniken und visuelle Aufnahmeverfahren ergeben. So kann untersucht werden, wie akute Entzündungsreaktionen aber auch chronische Prozesse wie die chronisch venöse Insuffizienz im Bereich der Beinvenen oder Reperfusionsschäden durch Antioxidantien und möglicherweise auch durch andere die Endothelzellen stabilisierende Substanzen beeinflusst werden.

## 6. Literatur

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100: 158-173
2. Akazwa K, Kameyama S., Mase R, Yamayaka T, Hashiba M. MPEG digital compression and analogue videotape: a comparison of moving images and electroencephalogram data in epileptic patients. *Med Inform Internet Med* 2004 Mar;29(1):57-63.
3. Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF Jr. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem* 2004;279:46637–43.
4. Baez S. Microvascular terminology. *Microcirculation* (Kaley G, Attura BM, eds.), University Park Press. Baltimore, MD. 1977.
5. Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of Endothelial Cell Architecture and Vascular Permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 2002; 29: 247-278
6. Baldwin AL, Thurston G. Changes in endothelial actin cytoskeleton in venules with time after histamine treatment. *Am J Physiol* 1995; 269: H1528-H1537
7. Barbier P, Alimento M, Berna G, Celeste F, Gentile F, Mantero A, Montericchio V, Muratori M. High-grade video compression of echocardiographic studies: a multicenter validation study of selected motion pictures expert groups (MPEG)-4 algorithms. *J Am Soc Echokariogr* 2007 May;20(5):527-36.
8. Boswell CA, Majno G, Joris I, Ostrom KA. Acute Endothelial Cell Contraction *in Vitro*: A Comparison with Vascular Smooth Muscle Cells and Fibroblasts. *Microvasc Res* 1992;43:178-191.
9. Braner D, Markovitz B. Digital image compression: pixels n' bits. *J Intensive Care Med* 2003 Jul-Aug;18(4):229-30.
10. Brown K, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. Neutrophil-Platelet Adhesion: Relative Roles of Platelet P-Selectin and Neutrophil  $\beta_2$  (CD18) Integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18: 100-110
11. Brüllmann D, Briseno B, Willershausen B, d'Hoedt B. Fast algorithm for real-time detection of root canal orifices in video images. *Int J Comput Dent* 2006 Oct;9(4):299-306.
12. Cardullo RA, Hinchcliffe EH. Digital manipulation of brightfield and fluorescence images: noise reduction, contrast enhancement, and feature extraction. *Methods Cell Biol* 2007;81:285-314.

13. Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC. Platelet-Leucocyte-Endothelial Cell Interaction on the Blood Vessel Wall. *Seminars in Hematology* 1997; 34: 327-335
14. Chan KY, Stich D, Voth GA. Real-time image compression for high-speed particle tracking. *Rev Sci Instrum* 2007 Feb;78(2):023704.
15. Cole R. Live cell imaging; the cell's perspective. *Cell Adhesion & Migration* 8:5, 452-459.
16. Curry FE. Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB* 1992;6:2456-2466.
17. Dejana E, Zanetti A, Del Maschio A. Adhesive Proteins at Endothelial Cell-to-Cell-Junctions and Leukocyte Extravasation. *Haemostasis* 1996; 26 (suppl 4): 210-219
18. Dendorfer A, Nees S, Gerlach E. Kompartimentierung des myokardialen Purinstoffwechsels: Studien an isolierten Kardiomyozyten und Mikrogefäßen des Meerschweinchenherzens. *Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU München* 1990
19. Dewitt S, Hallett MB. Optical complexities of living cytoplasm—implications for live cell imaging and photo-micromanipulation techniques. *J Microsc* 2011; 241:221-4.
20. Diaz Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* 1991; 6: 269-286
21. Durcan TM, Hinchcliffe EH. Digital image files in light microscopy. *Methods Cell Biol* 2007;81:315-33.
22. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol* 1996;59:100-115.
23. Egbrink MG, Van Gestel MA, Broeders MA, Tangelder GJ, Heemskerk JM, Reneman RS, Slaaf DW. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation* 2005 Apr-May;12(3):287-300.
24. Entwistle A. Formats of image data files that can be used for routine digital light micrography. Part one. *Biotech Histochem* 2003 Apr;78(2):77-89.
25. Entwistle A. Formats of image data files that can be used in routine digital light micrography. Part two. *Biotech Histochem* 2003 Apr;78(2):91-9.

26. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 1996;79:560-569
27. Farman AG. Fundamentals of image acquisition and processing in the digital era. *Orthod Craniofac Res* 2003;6 Suppl 1:17-22.
28. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF: Vesiculo-Vacuolar Organelles and the Regulation of Venule Permeability to Macromolecules By Vascular Permeability Factor, Histamine, and Serotonin. *J Exp Med* 1996;183:1981-1986.
29. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: An interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 7450-7454
30. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions In Vivo. *J Exp Med* 2000; 191: 1413-1422 (46)
31. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen C-P, Phan SA, Ligon GF, Perry CA. Flavonoids Inhibit Cytokine-Induced Endothelial Cell Adhesion Protein Gene Expression. *Am J Pathol* 1995; 147: 278-292
32. Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun.* 1994;2:7-14.
33. Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des* 2009; 15:1072–84.
34. Grega GJ, Adamski SW. The role of venular endothelial cells in the regulation of macromolecular permeability. *Micocirc Endothelium Lymphatics* 1988; 4: 143-167
35. Hammersen F. Endothelial Contractility – Ist Pros and Cons. *Bibl Anat* 1977;16:370-372.  
Herman IM, Pollard TD, Wong AJ. Contractile Proteins in endothelial cells. *NYAS* 1982;50-60.
36. Grega GJ. Contractile elements in endothelial cells as potential targets for drug action. *TIPS* 1986;452-457.
37. Grim M, Carlson BM. Alkaline Phosphatase and Dipeptidylpeptidase IV Staining of Tissue Components of Skeletal Muscle: A Comparative Study. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1907-1912
38. He P, Zhang H, Zhu L, Jiang Y, Zhou X. Leukocyte-platelet aggregate adhesion and vascular permeability in intact microvessels: role of activated endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Aug;291(2):H591-9.

39. Heltianu C, Simionescu M, Simionescu N. Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules. *J Cell Biol* 1982;93:357-364.
40. Hirschi KK, D'Amore. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32:687-698.
41. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, Ryder JJ, Hall WL, Cassidy A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88:38–50.
42. Jaffe E. Biochemistry, Immunology and Cell Biology of Endothelium. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice (Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW): 718-729. Philadelphia 1994.*
43. Juchem G, Nees S, Pohl U. Etablierung und Charakterisierung mikrovaskulärer Endothelzellen und Perizyten aus dem bovinen Koronarsystem in Gewebekultur. *Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU München 1999*
44. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific Accumulation of Circulating Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes on Platelet Thrombi in a Vascular Injury Model. *Blood* 1997; 89: 1270-1278 (53)
45. Koff DA, Shulman H. An overview of digital compression of medical images: can we use lossy image compression in radiology? *Can Assoc Radiol J* 2006 Oct;57(4):211-7.
46. Korthuis JR, Gute DC. Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction. *J Vasc Res* 1999;36:15-23.
47. Kron SJ. Digital time-lapse microscopy of yeast cell growth. *Methods Enzymol* 2002;351:3-15.
48. Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* 1994;152:3570-3577.
49. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. *The Journal of Immunology* 1995;155:525-528.
50. Linsley TA, Kerlin AM, Rising LJ. Time-lapse analysis of ethanol's effects on axon growth in vitro. *Brain Res Dev* 2003 Dec 30;147(1-2):191-9.
51. Lojda Z. Studies on Dipeptidyl(Amino)Peptidase IV (Glycyl-Proline Naphthylamidase). II Blood Vessels. *Histochemistry* 1979; 59: 153-166

52. Lossinsky AS, Shivers RR. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol* 2004 Apr;19(2):535-64.
53. Majno G, Palade GE, Schoefl GI. Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: A topographic study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:607-625.
54. Makkrides SC, Ryan US. Overview of the Endothelium.: *Thrombosis and Hemorrhage (Loscalzo J, Schaefer A): 295-307. Baltimore 1998.*
55. Manthey JA. Biological Properties of Flavonoids Pertaining to Inflammation. *Microcirculation* 2000;7:29-34.
56. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of P-Selectin. *Blood* 1998; 92: 507-515
57. McAfoos JA. Advances in digital video for electronic media. *Stud Health Technol Inform* 1997;46:477-80.
58. McDonald DM. Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am J Physiol* 1994;266:L61-L83.
59. McEver RP. Leucocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 840-849
60. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997;91:385-395.
61. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharm Rev* 2000; 52: 673-751
62. Mizuno R, Kamioka Y, Kabashima K, Imajo M, Sumiyama K, Nakasho E, Ito T, Hamazaki Y, Okuchi Y, Sakai Y, Kiyokawa E, Michiyuki M. In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *J. Exp. Med.* 2014 Vol. 211 No. 6 1123-1136.
63. Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across the endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 698-704
64. Nees S, Weiss D, Reichenbach-Klinke E, Rampp F, Heilmeier B, Kanbach J, Esperster A. Protective Effects of Flavonoids Contained in the Red Vine Leaf on Venular Endothelium Against the Attack of Activated Blood Components in vitro. *Drug Res* 2003; 53: 330-341

65. Nolte D, Schmid P, Jager U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D. Leukozyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am Physiol* 1994;267:H1637-H1642.
66. Nordberg JJ, Sluder G. Practical aspects of adjusting digital cameras. *Methods Cell Biol* 2007;81:159-69.
67. Prasad M, Montell DJ. Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. *Dev. Cell* 2007 Jun;12(6):997-1005.
68. Rhodin JA. Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* 1968;25:452-500.
69. Rieder CL, Cole RW. Microscopy-induced radiation damage, microtubules, and progression through the terminal stage of G2 (prophase) in vertebrate somatic cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2000; 65:369-76.
70. Rieder CL, Cole RW. Cold-shock and the Mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 2002; 1:169-75.
71. Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J* 1988; 2: 116-123
72. Rumbaut RE, Randhawa JK, Smith CW, Burns AB. Mouse Cremaster Venules are Predisposed to Light/Dye-Induced Thrombosis Independent of Wall Shear Rate, CD18, ICAM-1 or P-Selektin. *Microcirculation* 2004; 11:239-247
73. Ryschich E, Kerkadze V, Lizdenis P, Paskauskas S, Knaebel HP, Gross W, Gebhard MM, Büchler MW, Schmidt J. Active leukocyte crawling in microvessels assessed by digital time-lapse intravital microscopy. *J Surg Res* 2006 Oct;135(2):291-6.
74. Salierno M, Cabrera R, Filevich O, Etchenique R. Encapsulated Petri dish system for single-cell drug delivery and long-term time lapse microscopy. *Anal Biochem* 2007 Aug 10; [Epub vor Druck]
75. Salmon ED, Shaw SL, Waters J, Waterman-Storer CM, Maddox PS, Yeh E, Bloom K. A high-resolution multimode digital microscope system. *Methods Cell Biol* 2003;72:185-216.
76. Seeram E. Digital image compression. *Radiol Technol* 2005 Jul-Aug;76(6):449-45.
77. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J* 1993;7:195-203
78. Smith W. Possible steps Involved in the Transition to Stationary Adhesion of Rolling Neutrophils: A Brief Review. *Microcirculation* 2000; 7: 385-394



79. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-72.
80. Spring KR. Cameras for digital microscopy. *Methods Cell Biol* 2007;81:171-86.
81. Struckmann JR. Clinical Efficacy of Micronized Purified Flavonoid Fraction: An Overview. *J Vasc Res* 1999;36:37-41.
82. Swartz ML. Managing digital images. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000 Sep;118(3):354-8.
83. Thurston G, Baluk P, McDonald D. Determinants of Endothelial Cell Phenotype in Venules. *Microcirculation* 2000; 7: 67-80
84. Tözeren A, Ley K. How do selectins mediate leucocyte rolling in venules? *Biophys J* 1992;63:700-709.
85. Verkuyl JM, Matus A. Time-lapse imaging of dendritic spines in vitro. *Nat Protoc* 2006;1(5):2399-405.
86. Walmet PS, Eckman JR, Wich TM. Inflammatory mediators promote strong sickle cell adherence to endothelium under venular flow conditions. *Am J Hematol* 2003 Aug;73(4):215-24.
87. Ware JA, Heistad DD. Platelet-Endothelium Interactions. *New Engl J Med* 1993; 328: 628-635
88. Weiss DR, Nees S, Pohl U. „Perizyten“: Endothel-assoziierte Zellen, auch in der Intima der Aorta und Vena Saphena. *Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU München* 2004
89. Wiedemann MP, Tuma RF, Mayrovitz HN. An Introduction to Microcirculation. *Academic Press, New York, London* 1981
90. Wojciechowski JC, Sarelius IH. Preferential binding of leukocytes to the endothelial junction region in venules in situ. 1: *Microcirculation* 2005 Jun;12(4):349-59.
91. Yadav R, Larbi KY, Young RE, Nourshargh S. Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thromb Haemost* 2003 Oct;90(4):598-606.

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. S. Nees** (Physiologisches Institut der LMU München) für die Stellung von Arbeitsplatz, Material und Methoden sowie die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit durch Rat, Tat und ständiges Interesse.

Herzlicher Dank gebührt auch **Herrn Prof. Dr. U. Pohl** (Vorstand des Physiologischen Institutes der LMU München) für die Überlassung des Arbeitsplatzes und sein Interesse am Erfolg dieser Arbeit.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen und Mitdoktoranden **D. Weiss, E. Reichenbach-Klinke** und **J. Kanbach** danke ich für die Unterstützung insbesondere bei aufwendigeren Versuchen, wenn mehr als zwei Hände von Nöten waren.

Dank gebührt auch dem Vorstand und den Mitarbeitern des Lehrstuhls Anatomie III des Anatomischen Institutes der LMU München, insbesondere zu nennen hier **Frau Ziesche**, die mich bei der Durchführung von Mikrotomschnitten mit Rat und Tat unterstützen

Den Herren **F. Singer, M. Buchner** und **J. Feuerstein** (Feinmechaniker des Physiologischen Instituts) möchte ich für ihre technische und handwerkliche Unterstützung bei der Realisierung neuer Gerätschaften und Ansätze danken.

Nicht zuletzt möchte ich **meinen Eltern** herzlich danken, ohne deren Unterstützung Studium und Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen wären.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Rampp, Florian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Etablierung eines digitalen Bildgebungssystems zur Dokumentation zellulärer Interaktionen auf dem Gewebekulturmikroskop. Erprobung an speziell etablierten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Koronarsystem von Ratte und Mensch“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Taufkirchen, 05.12.17

Ort, Datum

Florian Rampp

Unterschrift  
Doktorandin/Doktorand